

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

NOUVELLES APPROCHES VACCINALES CONTRE LE ROTAVIRUS
HUMAIN ET EFFET ADJUVANT DE LA FLAGELLINE

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR
AURÉLIE GIRARD

JUIN 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

*À Mathieu, à ma famille et amis,
Bien entourée, le chemin paraît moins long.*

C'est difficile mais c'est beau.

Sœur Louise Bonta

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord exprimer ma gratitude à mon directeur de recherche, le Dr Denis Archambault, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je tiens aussi à le remercier pour sa confiance, ses conseils et son aide pendant toutes ces années de doctorat.

Je souhaiterais aussi remercier mon co-directeur de recherche, le Dr Bernard Massie, pour ses conseils et pour avoir développé le système d'adénovecteur étudié dans cette thèse. Merci aussi à son équipe pour son accueil chaleureux à l'Institut de Recherche en Biotechnologies du Conseil National de Recherches Canada (IRB-CNRC) et pour les conseils techniques.

Je désirerais également remercier les membres du jury pour le temps consacré à l'évaluation de cette thèse.

Je tiens particulièrement à remercier mes collègues et amies, Mesdames Élodie Roques et Andrea Gomez-Corredor, pour tous ces bons moments partagés au laboratoire et pour leur soutien inconditionnel pendant les moments difficiles. Votre courage et ténacité m'ont beaucoup inspirée. Merci les filles !

Je voudrais remercier tous mes collègues du laboratoire et de l'Université du Québec à Montréal. D'autres chercheurs ont positivement influencé ces travaux. Je pense particulièrement aux Drs Fathey Sarhan et François Ouellet. Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à Madame Marie-Claude St-Louis pour sa contribution aux travaux, son aide technique et ses précieux conseils. Je tiens aussi à remercier mes

collègues, Messieurs Wilfried Saron et Louis-Philippe Bergeron-Sandoval, pour leur contribution à mon premier article. Un grand merci aux techniciens Philippe Cournoyer et Amélie Bourget ainsi qu'aux nouveaux étudiants pour votre bonne humeur et discussions enrichissantes.

Je souhaiterais remercier les Drs Denis Archambault, Lucie Lamontagne, Tatiana Scorza et Catherine Mounier, Monsieur Christian Bleau ainsi que le personnel technique dont Mesdames Hélène Beaumier, Marie-Josée Carbonneau et Monsieur Luc Dubé pour l'expérience formidable partagée en enseignement.

J'aimerais dire un grand merci à Cynthia Torresilla pour son amitié et son aide précieuse dans la relecture de cette thèse. Merci aussi à Denis Flipo, Gabrielle Vernouillet, Monique Boily et Johanne Vachon pour leur aide, les dépannages et le support moral.

Je tiens aussi à souligner l'importance de la fondation de l'Université du Québec à Montréal pour les bourses qui m'ont été octroyées ainsi que les Instituts de Recherche en santé du Canada (IRSC) et le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie de Canada (CRSNG) pour le financement de ce projet de doctorat.

J'adresse ma profonde gratitude à ma famille, mes parents et ma sœur Marion qui, avec leurs conseils et appui constants, m'ont grandement motivée à poursuivre mon doctorat malgré la distance et les sacrifices consentis.

Finalement Mathieu Cambos, toi avec qui je partage ma vie, je désire te remercier encore pour ton incroyable soutien, ta compréhension, ton aide, tes conseils. Le chemin parcouru pendant toutes ces années m'a paru beaucoup moins long grâce à toi.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xiv
RÉSUMÉ	xix
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	7
1.1 Rotavirus.....	7
1.1.1 Caractéristiques générales.....	7
1.1.2 Classification.....	10
1.1.3 Impact des rotaviroses sur les populations humaines	10
1.1.4 Prévalence	12
1.1.5 Pathologies	13
1.1.6 Cycle de réplication du rotavirus	15
1.1.7 Réponse immunitaire pendant l'infection	19
1.2 Vaccins anti-rotavirus	28
1.2.1 Généralités sur les vaccins	28
1.2.2 Vaccins anti-rotavirus commerciaux.....	32
1.2.3 Autres voies de recherche	34
1.3 Les adénovirus recombinants comme vecteurs vaccinaux	48
1.3.1 Classification des adénovirus.....	48
1.3.2 Morphologie des adénovirus.....	48
1.3.3 Cycle de réplication.....	50
1.3.4 Utilisation des adénovirus dans des applications biomédicales	52

1.3.5	Utilisation des AdV et réponses immunitaires induites	55
1.3.6	Stratégies pour améliorer l'utilisation de ces vecteurs.....	57
1.4	La flagelline de <i>Salmonella typhimurium</i>	60
1.4.1	Flagelline : structure et interaction avec le système immunitaire	60
1.4.2	Flagelline : interaction avec le TLR5 et voies de signalisation	64
1.4.3	Flagelline : interaction avec l'inflammasome et voies de signalisation.....	66
1.4.4	Usage de la flagelline comme adjuvant dans des études de vaccination	68

CHAPITRE II

ROTAVIRUS-SPECIFIC IMMUNE RESPONSE IN MICE IMMUNIZED WITH REPLICATING BUT NON DISSEMINATING ADENOVIRUS VECTORS EXPRESSING HUMAN ROTAVIRUS STRUCTURAL PROTEINS.....		72
2.1	Abstract	74
2.2	Introduction.....	75
2.3	Material and methods.....	78
2.3.1	Cell cultures	78
2.3.2	Generation of gene constructs for expression in Mammalian cells	78
2.3.3	Construction of AdVs	78
2.3.4	Recombinant protein production.....	79
2.3.5	Western blot assay.....	80
2.3.6	Rotavirus Wa strain propagation and purification	80
2.3.7	Immunization of mice	81
2.3.8	Indirect Immunofluorescence Assay (IFA).....	82
2.3.9	Indirect ELISA	82
2.3.10	Rotavirus neutralization assay.....	83
2.3.11	Spleen lymphocyte proliferation assay	83
2.3.12	Statistical analysis	84

2.4 Results.....	85
2.4.1 Expression of VP7, VP4, VP4 Δ , and VP4 Δ ::VP7 constructs in mammalian cells.....	85
2.4.2 Immunogenicity of HRV VP4 Δ delivered by AdVs.....	85
2.4.3 VP7, VP4, VP4 Δ or VP4 Δ ::VP7 immunogens induce HRV-specific Ab responses	86
2.4.4 CMI response to HRV	87
2.5 Discussion.....	96
2.6 Acknowledgements.....	100

CHAPITRE III

FLAGELLIN IN FUSION WITH HUMAN ROTAVIRUS STRUCTURAL PROTEINS EXERTS AN ADJUVANT EFFECT WHEN DELIVERED WITH REPLICATING BUT NON DISSEMINATING ADENOVECTORS THROUGH THE INTRARECTAL ROUTE	101
3.1 Abstract	103
3.2 Introduction.....	104
3.3 Material and methods.....	107
3.3.1 Cell cultures	107
3.3.2 Recombinant adenoviruses.....	107
3.3.3 Protein expression	108
3.3.4 Rotavirus production.....	109
3.3.5 In vivo studies in mice	109
3.3.6 Indirect ELISA	110
3.3.7 Rotavirus neutralization assay.....	111
3.3.8 Spleen lymphocyte proliferation assay	112
3.3.9 Analysis of colonic innate immunity in intrarectally inoculated mice .	112
3.3.10 Statistical analysis	113
3.4 Results.....	114

3.4.1	Protein expression from adenovectors	114
3.4.2	FljB and VP4Δ::VP7::FljB expressed in J774A.1 macrophages induces IL-1β secretion	115
3.4.3	FljB fusion with VP4Δ::VP7 enhances antibody (Ab) response to HRV when using R-AdV inoculated through the intrarectal route	115
3.4.4	Replicating but non disseminating AdV (R-AdV) is more efficient than replication-defective AdV (RD-AdV) in inducing an immune response specific to VP4Δ::VP7::FljB	116
3.4.5	Adenovectors expressing VP4Δ::VP7::FljB induce immune responses specific to FljB	117
3.4.6	FljB and VP4Δ::VP7::FljB delivered intrarectally by adenovectors do not induce colonic inflammatory cytokine production	117
3.5	Discussion	128
3.6	Acknowledgements	133

CHAPITRE IV

FLAGELLIN PRODUCED IN PLANTS IS A POTENT ADJUVANT FOR ORAL IMMUNIZATION		134
4.1	Abstract	136
4.2	Introduction	137
4.3	Material and methods	141
4.3.1	Transient expression of FljB in <i>Nicotiana benthamiana</i>	141
4.3.2	Production and purification of recombinant FljB in <i>E. coli</i>	142
4.3.3	Characterization of recombinant FljB produced in plants and in <i>E. coli</i>	142
4.3.4	Immunization of mice	143
4.3.5	Sample collection	143
4.3.6	Indirect ELISA	144
4.3.7	Spleen lymphocyte proliferation assay	145

4.3.8 Statistical analysis	146
4.4 Results.....	147
4.4.1 Yield and stability of recombinant FljB in plants	147
4.4.2 Plants expressing FljB enhance antibody response to OVA.....	147
4.4.3 Plants expressing FljB induce cell-mediated immune response to OVA	149
4.4.4 Plants expressing FljB do not generate immune response to FljB.....	149
4.5 Discussion.....	156
4.6 Acknowledgements.....	159
CHAPITRE V	
DISCUSSION	160
5.1 Vaccin sous-unitaire anti-rotavirus	161
5.1.1 Choix de la souche de rotavirus	161
5.1.2 Limites du modèle d'étude.....	162
5.2 Protéines de fusion et augmentation de la réponse immunitaire.....	166
5.2.1 Expression des protéines du rotavirus.....	166
5.2.2 Expression de FljB en fusion ou seule	167
5.3 Les différentes voies d'administration.....	170
5.3.1 La compartimentalisation de la réponse immunitaire en fonction des voies d'administration d'un antigène	170
5.3.2 La voie intramusculaire.....	171
5.3.3 La voie orale.....	172
5.3.4 Les voies mucosales alternatives à la voie orale	178
5.4 FljB et effets adjuvants	184
5.4.1 Capacité de FljB à stimuler une réponse innée <i>in vitro</i>	184
5.4.2 Réplication des AdV et FljB, un effet synergique sur la réponse innée?	185

5.4.3	Pertinence du modèle des cellules J774A.1 et effet adjuvant de FljB <i>in vivo</i>	187
5.4.4	FljB et inflammation <i>in vivo</i>	188
5.4.5	AdV réplicatif non disséminatif exprimant FljB et thérapie anti- cancer	189
CONCLUSIONS.....		191
APPENDICE A TABLEAUX ET FIGURES SUPPLÉMENTAIRES		194
APPENDICE B ARTICLES SCIENTIFIQUES		198
APPENDICE C PARTICIPATIONS À DES CONGRÈS SCIENTIFIQUES.....		205
RÉFÉRENCES.....		208

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Segments du génome, protéines du rotavirus et modèle de la structure du virion.	9
1.2 Représentation des taux de mortalité due aux rotaviroses dans le monde en 2008, d'après l'OMS.....	11
1.3 Les différentes familles de PRR.....	22
1.4 Reconnaissance de PAMP de différents pathogènes.	23
1.5 Structure des adénovirus.	49
1.6 Structure des adénovirus avec les protéines mineures et nucléocapsidiques.....	50
1.7 Organisation du génome des Ad5.	51
1.8 Modification du génome des Ad5 dans le but de faire des vecteurs viraux.....	54
1.9 Modélisation de la structure de la flagelline.	61
1.10 Transduction du signal après la liaison des PAMPs aux TLRs.	65
1.11 Comparaison de la séquence des 35 acides aminés en C-terminal de la flagelline de différentes bactéries Gram négatives.	66
1.12 Activation de l'inflammasome du macrophage par la flagelline monomérique intracellulaire.	68
2.1 Expression in mammalian cells of VP7, VP4, VP4 Δ , and VP4 Δ ::VP7 constructs through replicating but non disseminating adenovector (AdV) or plasmid DNA delivery systems.	89
2.2 Preliminary experiment design and kinetics of anti-HRV IgG antibody production as determined by indirect immunofluorescence assay (IFA).....	90
2.3 Antibody (Ab) response in mice immunized intramuscularly with constructs expressing various HRV immunogens.	92
2.4 Characterization of antibody (Ab) isotypes and neutralizing Ab response specific to HRV on day 40 post primary immunization from the same groups of mice described in the legend of Fig. 2.3.	94

2.5	HRV-specific lymphoproliferation response from spleen cells of mice on day 40 post primary immunization.....	95
3.1	Expression of FljB constructs in mammalian cells through replicating but non disseminating AdV (R-AdV) or replicative-defective AdV (RD-AdV) delivery systems.	120
3.2	HRV-specific systemic antibody responses in mice immunized intrarectally with constructs expressing HRV immunogens either individually or fused to FljB.	122
3.3	HRV-specific intestinal IgA response in mice immunized intrarectally with constructs expressing HRV immunogens either individually or fused to FljB.	123
3.4	HRV-specific lymphoproliferative response from mice spleen cells on day 42 post primary immunization.	124
3.5	Systemic and intestinal immune responses specific to FljB in mice immunized intrarectally with constructs expressing HRV immunogens either fused or not to FljB.	125
3.6	Inflammation study in mice immunized intrarectally with R-AdV expressing GFP, FljB, VP4Δ::VP7, VP4Δ::VP7::FljB or with RD-AdV expressing VP4Δ::VP7::FljB.	126
4.1	Stability of FljB expressed in <i>N. benthamiana</i>	150
4.2	Experimental design and production of serum OVA-specific IgGs in orally-immunized BALB/c mice.....	151
4.3	Serum OVA-specific antibody isotype production in orally-immunized BALB/c mice.	152
4.4	OVA-specific IgA antibodies in intestinal washes of orally immunized BALB/C mice.	153
4.5	OVA- and FljB-specific spleen white cell proliferation responses of orally immunized BALB/C mice.....	154
4.6	Analysis of FljB-specific serum and intestinal antibody production in orally immunized BALB/C mice.	155
A.1	Anticorps neutralisants les AdV générés dans le sérum de souris après des immunisations intramusculaires (IM) ou intrarectales d'AdV (IR)	

réplicatifs, non disséminatifs (R-AdV) ou d'AdV non réplacatis (RD-AdV).....	196
A.2 Production d'IL-6 et de TNF- α dans les côlons de souris 48 h après des injections intrarectales d'AdV.....	197

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Fonctions des différentes protéines du rotavirus dans le cycle de réplication virale.....	18
1.2 Comparaison de l'infection par le rotavirus chez les jeunes enfants et chez différents modèles animaux.	20
1.3 Historique des vaccins atténués vivants.....	29
1.4 Quelques exemples de virus et bactéries les plus utilisés comme vecteurs vaccinaux.....	30
1.5 Études chez la souris de vecteurs bactériens pour des vaccins anti-rotavirus.....	41
1.6 Vaccins contre le rotavirus à base de plantes transgéniques.....	44
1.7 Adjuvants employés dans des vaccins sous-unitaires anti-rotavirus.....	46
1.8 Usage des vecteurs viraux dans des vaccins testés en études cliniques enregistrées au http://clinicaltrials.gov (consulté le 24 avril 2012).	53
1.9 Liste de cytokines et chimiokines produites suite à l'activation du TLR5 ou de l'IPAF par la flagelline sur des cellules épithéliales ou des cellules myéloïdes	63
1.10 Utilisation de la flagelline comme adjuvant dans des études de vaccinations.....	71
A.1 Positions et séquences des épitopes ciblés par des anticorps neutralisant le rotavirus.....	197

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AAV	Virus associé aux adénovirus
Ab	<i>Antibody</i>
Ad	Adénovirus
Ad5	Adénovirus de sérotype 5
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNdb	Acide désoxyribonucléique double brin
AdV	Vecteur adénoviral
Ag	<i>Antigen</i>
ANOVA	<i>One-way analysis of variance</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNdb	Acide ribonucléique double-brin
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASC	<i>Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD</i>
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BCR	Récepteur des lymphocytes B
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
Ca ²⁺	Ions calcium
CAR	<i>Coxsackie and adenovirus receptor</i>
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
Cellules M	Cellules microplis
CDX	<i>Cluster of differentiation X</i> (exemple CD4, CD8, etc...) présent à la surface des cellules
CCL	Chimiokines
CCR	Récepteurs spécifiques à des chimiokines
CMH I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CMI	<i>Cell-mediated immune response</i>
CpG	Séquence d'ADN riche en GC
CsCl	Chlorure de césium
CT	Toxine du choléra
CTB	Sous-unité B de la toxine du choléra
CXCL	Chimiokines
DMEM	<i>Dulbecco minimal essential medium</i>
E1	Région E1 du génome de l'adénovirus exprimée dans la phase précoce du cycle de réplication. Cette région a deux parties (E1A et E1B)
E2	Région E2 du génome de l'adénovirus exprimée dans la phase précoce du cycle de réplication
E3	Région E3 du génome de l'adénovirus exprimée dans la phase précoce du cycle de réplication
E4	Région E4 du génome de l'adénovirus exprimée dans la phase précoce du cycle de réplication
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FFU	<i>Focus-forming units</i>
Fla	Flagelline de <i>Legionella pneumophila</i>
FljB	Variante antigénique B de la flagelline de <i>Salmonella typhimurium</i>
FliC	Variante antigénique C de la flagelline de <i>S. typhimurium</i>
FW	<i>Fresh weight</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GSK	GlaxoSmithKline

HEK 293A	<i>Human embryonic kidney 293 A</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HRV	<i>Human rotavirus</i>
IFA	<i>Indirect immunofluorescence assay</i>
IFN	Interféron
IFN- α	Interféron α (un interferon de type I)
IFN- γ	IFN- γ : Interféron γ (interferon de type II)
Ig	Immunoglobuline
IgG	Immunoglobuline d'isotype G
IgA	Immunoglobuline d'isotype A
IgG1	Immunoglobuline d'isotype G et de sous-classe 1
IgG2a	Immunoglobuline d'isotype G et de sous-classe 2a
IgG2b	Immunoglobuline d'isotype G et de sous-classe 2b
IgG3	Immunoglobuline d'isotype G et de sous-classe 3
IL	Interleukine
IPAF	<i>ICE-protease activating factor</i>
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
IRF-3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
L1 à L5	Régions du génome de l'adénovirus exprimées dans la phase tardive du cycle de réplication
LB	Lymphocytes B
LPS	Lipopolysaccharide.
LT	Toxine thermolabile d' <i>Escherichia coli</i> .
MAdCAM-1	adressine vasculaire des muqueuses 1.
MAP-kinase	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i> ; il existe deux formes (MIP-1 α et MIP-1 β)

MLP	<i>Major late promoter</i> du génome des adénovirus
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
Myd88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NAb	<i>Neutralizing antibody</i>
NAIP5	<i>Neuronal apoptosis inhibitor protein 5</i>
NALP	<i>NACHT-, LRR- and pyrin-domain-containing proteins</i>
NLRs	<i>NOD-like receptors</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
NSP	Protéines non structurales du rotavirus, il en existe 6
OD	<i>Optical density</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OVA	Ovalbumine
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PBS-T	PBS-Tween 20 (0.05 % volume/volume)
PPI	<i>Post primary immunization</i>
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
PS	Protéase de l'adénovirus, impliquée dans l'assemblage des virions
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
R-AdV	vecteur adénoviral répliquatif non disséminatif
RD-AdV	vecteur adénoviral non répliquatif
RLR	<i>Retinoid acid-inducible gene I-like receptor</i>
RRV	<i>Rhesus simian rotavirus</i>
SDS	<i>Sodium-dodecyl-sulfate</i>
SI	<i>Stimulation Index</i>
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience Humaine
sIgA	Immunoglobuline d'isotype A, dimérique et sécrétée au niveau des muqueuses

SRRP	Syndrome reproducteur et respiratoire porcin
TCID ₅₀	<i>Median tissue culture infective dose</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TIR	<i>Toll/Interleukine-1 receptor-like domain</i>
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
Th1	Lymphocytes T auxiliaires de type 1; ils contrôlent une réponse immunitaire dite de type Th1
Th2	Lymphocytes T auxiliaires de type 2; ils contrôlent une réponse immunitaire dite de type Th2
Th3	Lymphocytes T auxiliaires de type 3; ils contrôlent une réponse immunitaire dite de type Th3
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMB	<i>3, 3', 5,5'-tetramethyl-benzidine</i>
TNBS	<i>2, 4, 6 trinitrobenzene sulfonic acid</i>
TNC	Tris-sodium-calcium
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon-β</i>
UV	Rayon ultra-violet
VCAM	<i>Vascular Adhesion Molecule</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLP	<i>Virus-Like Particles</i> , particule pseudo-virale
VP	Protéines structurales du rotavirus, il en existe six : VP1, VP2, VP3, VP4 (qui se clive en deux protéines appelées VP5* et VP8*), VP6 et VP7
VSV	Virus de la Stomatite Vésiculaire
WHO	<i>World Health Organization</i>

RÉSUMÉ

La vaccination a permis d'énormes progrès en santé humaine et animale pour lutter contre les maladies infectieuses. Les premiers types de vaccins mis au point étaient composés de pathogènes entiers inactivés ou atténués. Les pathogènes inactivés n'induisent pas toujours une réponse protectrice à l'opposé des pathogènes vivants atténués qui reproduisent une infection naturelle. Cependant ces derniers peuvent induire des effets secondaires plus au moins graves qui sont des freins à l'utilisation de ces vaccins. Dans le but d'offrir une sécurité plus grande, des vaccins sous-unitaires composés de quelques composants d'un pathogène ont été développés. Malheureusement ces vaccins se révèlent moins efficaces que des pathogènes atténués et pour cela différentes stratégies d'optimisation sont poursuivies. L'objectif global de ces travaux est d'étudier de nouvelles stratégies vaccinales pour l'élaboration de vaccins sous-unitaires.

Le pathogène servant de modèle à cette étude est le rotavirus humain (souche Wa). Les rotavirus, virus non enveloppés et à ARN double brin, sont une des causes majeures des gastro-entérites chez les enfants de moins de cinq ans et ils représentent un problème mondial de santé publique. En 1999, un vaccin vivant atténué a été retiré du marché seulement un an après son introduction car des cas mortels d'invagination intestinale ont été reliés à son utilisation. Depuis 2006, deux nouveaux vaccins atténués ont été introduits mais aucun vaccin sous-unitaire n'est actuellement disponible. Les deux protéines VP4 et VP7 formant la capside externe des virions permettent de générer à elles seules une immunité protectrice contre le rotavirus en induisant une réponse en anticorps neutralisants. Notre étude montre qu'une protéine chimérique VP4 Δ ::VP7 (issue d'une fusion d'une protéine VP4 Δ comprenant les 336 premiers acides aminés de VP4 avec la protéine VP7) a permis de générer une réponse immunitaire notamment en anticorps neutralisants plus forte que l'administration d'un mélange de VP4 et VP7. La protéine VP4 Δ ::VP7 semble être une bonne candidate pour un vaccin sous-unitaire contre le rotavirus, ce qui devra être vérifié par une expérience de défi.

D'autre part, le vecteur choisi dans cette étude pour administrer ces protéines du rotavirus est un vecteur adénovirus (AdV) de type 5 réplcatif mais non disséminatif pour assurer une meilleure sécurité quant à son utilisation. Ces AdV se sont révélés efficaces pour administrer les antigènes par voie intramusculaire et par voie intrarectale chez la souris. L'utilisation de ces vecteurs peut être optimisée en limitant la réponse en anticorps neutralisant le vecteur par le recours à une stratégie vectorielle combinatoire AdV/plasmide par voie intramusculaire. Les quantités

d'anticorps neutralisant ces vecteurs peuvent aussi être réduites par l'utilisation de la voie intrarectale. La réplication de ces vecteurs a aussi permis de générer une réponse immunitaire plus forte contre le rotavirus chez la souris.

Finalement la flagelline de *Salmonella typhimurium* (FljB) a été étudiée pour ses capacités adjuvantes chez la souris. Cette protéine a montré un effet adjuvant dans deux contextes encore jamais rapportés jusqu'à aujourd'hui. Plus précisément, FljB fusionnée à un antigène et exprimée par un AdV réplcatif non disséminatif et FljB exprimée dans des plantes transgéniques ensuite mélangée à un antigène ont démontré un effet adjuvant.

En conclusion, ces travaux ont permis d'apporter plusieurs connaissances nouvelles dans la recherche portant sur les vaccins sous-unitaires en proposant un nouvel immunogène pour vacciner contre le rotavirus, en montrant l'efficacité d'un nouveau AdV réplcatif, non disséminatif et enfin en montrant l'effet adjuvant de FljB avec de nouveaux moyens d'administration par voies mucosales.

Mots-clés : vaccin sous-unitaire, adjuvant, rotavirus, VP7, VP4, protéine de fusion, vecteur adenovirus, plante transgénique, voie orale, voie intrarectale, stratégie vectorielle combinatoire.

INTRODUCTION

Un vaccin a pour but de protéger un sujet contre un agent infectieux en évitant ou en atténuant les conséquences de l'infection. Depuis la fin du XIX^{ème} siècle, la vaccination a permis d'énormes progrès dans la lutte contre les maladies infectieuses et est aujourd'hui un outil incontournable en santé humaine et animale. L'éradication de la variole en est le meilleur exemple revu dans (Plotkin, 2005). Les premiers types de vaccins mis au point étaient composés de pathogènes entiers inactivés ou atténués. Ils sont encore employés aujourd'hui et revus dans (Plotkin, 2005; Shaw, 2006). Comme leurs noms l'indiquent, ils sont composés de pathogènes modifiés de telle manière qu'ils n'induisent pas de maladie. Cependant l'emploi de pathogènes vivants comporte plusieurs risques comme celui de provoquer des infections graves chez des sujets immunodéprimés ou celui de regain de virulence lorsque le pathogène entre en contact avec des souches sauvages (Plotkin, 2009; Plotkin et Plotkin, 2011). De plus, l'utilisation de pathogènes entiers tués ne permet pas dans certains cas comme celui du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) d'obtenir une protection. Pour ces raisons, d'autres stratégies pour l'élaboration de vaccins ont été mises en place. Les vaccins sous-unitaires, formés seulement de certains composants d'un pathogène, ont ainsi été élaborés et revus dans (Plotkin, 2005).

Dans bien des cas, les vaccins sous-unitaires n'induisent pas de réponses immunitaires aussi fortes que les pathogènes vivants atténués (Mishra et al., 2010; Silin et al., 2007). Ils doivent être donc employés avec des adjuvants qui permettent d'améliorer la réponse immunitaire contre le vaccin (Reed et al., 2009), ou bien administrés par des vecteurs (Robert-Guroff, 2007), qui permettent de mieux présenter le vaccin au système immunitaire. L'objectif global de cette thèse de doctorat est d'étudier de nouvelles stratégies vaccinales pour l'élaboration de vaccins

sous-unitaires. Le pathogène servant de modèle à notre étude sera le rotavirus humain. Le vecteur choisi pour administrer certaines protéines du rotavirus sera un adénovirus de type 5 réplcatif mais non disséminatif. Finalement, la flagelline de *Salmonella typhimurium* sera étudiée pour ses capacités adjuvantes.

Les rotavirus sont une des causes majeures des gastro-entérites chez les enfants de moins de cinq ans et ils représentent un problème de santé publique à l'échelle mondiale (Soares-Weiser et al., 2010). L'incidence des infections à rotavirus est la même partout dans le monde, pays industrialisés et pays en développement confondus (Boschi-Pinto et al., 2008). Il existe cinq groupes prévalents dont le G1P[8] (Santos et Hoshino, 2005). La mortalité, estimée à 610 000 décès par an, est beaucoup plus élevée dans les pays en développement du fait du peu d'accès aux soins médicaux, de la malnutrition et de la présence d'infections concomitantes (Parashar et al., 2006; Santos et Hoshino, 2005; World-Health-Organization, 2007). Un premier vaccin composé de souches atténuées vivantes a été commercialisé en 1998 mais a été retiré rapidement après car son utilisation a été reliée à des cas d'invagination intestinale conduisant à la mort des nourrissons vaccinés (Franco et al., 2006). Deux autres vaccins vivants-atténués, Rotateq® et Rotarix®, sont commercialisés depuis le printemps 2006 (Angel et al., 2007). Une pharmacovigilance attentive a cependant été mise en place dès leur mise sur le marché (Arvin et Greenberg, 2006; Minodier et al., 2007).

Les rotavirus infectent les entérocytes différenciés des villosités localisées dans le jéjunum du petit intestin. Dans ces cellules, les nouveaux virions sont formés et la diarrhée assure leur propagation dans l'environnement (Leung et al., 2005). De plus, des études récentes ont mis en évidence que le virus ne reste pas confiné dans la muqueuse intestinale mais s'échappe et se retrouve au niveau de différents organes (Blutt et Conner, 2007; Iturriza-Gomara et al., 2002). Les anticorps neutralisant le rotavirus au niveau systémique et au niveau intestinal sont à l'heure actuelle le

meilleur marqueur d'une protection contre une infection à rotavirus (Franco et al., 2006). Les protéines VP4 et VP7 constituent les protéines de la capside externe des rotavirus et sont les seules à porter des épitopes cibles d'anticorps neutralisants. Elles ont d'ailleurs été utilisées individuellement à plusieurs reprises comme antigènes dans des vaccins sous-unitaires (Choi et al., 1998; Qiao et al., 2009; Wigdorovitz et al., 2004).

La première hypothèse de cette thèse est que la construction d'antigènes chimériques permet d'augmenter la réponse immunitaire générée contre le rotavirus en comparaison avec des antigènes seuls. Le premier objectif consistera à générer une protéine chimérique (appelée VP4Δ::VP7) à partir de VP7 et VP4 de la souche Wa appartenant au groupe G1P[8] comme antigène dans des vaccins sous-unitaires. VP4Δ est une forme tronquée de VP4 contenant les 336 premiers acides aminés de cette dernière et elle est fusionnée à VP7 en entier.

Utilisés dans des vaccins sous-unitaires, les vecteurs viraux présentent l'avantage de reproduire une infection virale et de produire non seulement une réponse immunitaire en anticorps mais aussi une réponse à médiation cellulaire (Nakagawa et al., 2001; Souza et al., 2005). Avec les poxvirus, les adénovirus (Ad) sont les virus les plus utilisés en vaccinologie pour construire des vecteurs (Souza et al., 2005; Tatsis et Ertl, 2004). Les vecteurs adénovirus (AdV) les plus employés sont modifiés pour empêcher la réplication virale. En effet, l'emploi d'AdV réplicatifs sous-entend les mêmes risques que des vaccins à base de pathogènes atténués vivants. Cependant la réplication des AdV peut présenter des avantages comme une augmentation de l'expression de l'antigène d'intérêt (Bourbeau et al., 2007) ou bien une plus grande activation de l'immunité innée qui peuvent conduire à une plus grande réponse immunitaire contre cet antigène (Huarte et al., 2006; Russell, 2009; Zhu et al., 2007). Dans cette optique, la deuxième hypothèse de cette thèse est que

des AdV réplicatifs mais non disséminatifs seront des vecteurs capables de générer une réponse immunitaire spécifique à un antigène d'intérêt. L'objectif sera d'employer ces AdV pour comparer l'immunogénicité de différentes protéines du rotavirus (VP7, VP4, VP4 Δ et VP4 Δ ::VP7) et de les administrer par une voie systémique.

Bien que les muqueuses représentent la voie d'entrée la plus importante pour beaucoup de pathogènes, la majorité des vaccins commerciaux sont administrés par injection systémique (Plotkin, 2005). Peu de vaccins commerciaux sont employés par des voies mucosales incluant les voies orale, intranasale ou encore intrarectale (Belyakov et Ahlers, 2009; Plotkin, 2005). Cependant aucun vaccin expérimental administré par voie systémique n'a permis d'obtenir une protection contre certains pathogènes comme le VIH, le virus de l'herpès ou de l'hépatite C (Belyakov et Ahlers, 2009; Belyakov et al., 2001; Kozlowski et al., 1997; Neutra et Kozlowski, 2006; Wang et al., 2004). Plusieurs études ont montré qu'une protection plus importante pouvait être atteinte lorsque des voies mucosales étaient employées plutôt que des injections systémiques (Belyakov et Ahlers, 2009; Mason et al., 2008; Neutra et Kozlowski, 2006; Silin et al., 2007). L'usage des voies mucosales apparaissent comme une nouvelle stratégie pour l'amélioration des vaccins (Belyakov et Ahlers, 2009).

Un troisième objectif de cette étude sera d'établir une preuve de concept de l'utilisation des AdV réplicatifs mais non disséminatifs par une voie mucoale. Le rotavirus s'avère un modèle adéquat pour tester des vaccins administrés par voie intestinale. Même si les AdV ont le potentiel d'infecter tous les épithéliums, ils résistent mal au pH acide de l'estomac (Cheng et al., 2003). Leur usage est peu efficace par voie orale (Liu et al., 2005). D'autre part, des études avec des antigènes du rotavirus ont montré que des immunisations par la voie intrarectale peuvent conduire à une réponse immunitaire dans l'intestin grêle (McNeal et al., 2007; Parez

et al., 2006). De plus, les AdV peuvent infecter la muqueuse colorectale (Zhu et al., 2008). C'est pourquoi une troisième hypothèse de ce travail est que la voie intrarectale est adéquate pour générer une réponse immunitaire contre le rotavirus grâce à des AdV réplcatifs, non disséminatifs.

La flagelline, monomère formant les flagelles bactériens, est une protéine très conservée parmi les bactéries. Elle contient des PAMP (pour «Pathogen-Associated Molecular Pattern») reconnus par des récepteurs de l'immunité innée (Miao et al., 2007). Dans des essais de vaccination, plusieurs flagellines et notamment FljB de *Salmonella typhimurium* ont montré des capacités à augmenter et à moduler la réponse immunitaire contre d'autres antigènes lorsque administrée en mélange ou en fusion avec ceux-ci (Bargieri et al., 2010; Honko et al., 2006; Lee et al., 2006; Miao et al., 2007; Pino et al., 2005; Salman et al., 2009; Takata et al., 2006). La liaison de la flagelline au récepteur «Toll-like» 5 (TLR5) extracellulaire de l'immunité innée est un mécanisme à l'origine de cet effet adjuvant (Miao et al., 2007). D'autre part, les flagellines peuvent aussi activer des récepteurs intracellulaires de l'immunité innée (Miao et al., 2007).

La dernière hypothèse de cette thèse est que FljB en fusion ou en mélange avec un antigène peut avoir des capacités adjuvantes lorsque administrée de manière intracellulaire par des AdV ou extracellulaire par un vecteur plante. Un objectif sera de fusionner FljB à la protéine VP4Δ::VP7 du rotavirus et de l'administrer grâce à un AdV réplcatif mais non disséminatif par voie intrarectale. Ensuite, comme l'effet adjuvant de FljB produite dans des systèmes d'expression bactérien a déjà été montré (Pino et al., 2005; Salman et al., 2009; Xu et al., 2011), le dernier objectif de cette étude sera de caractériser les effets adjuvants de plantes exprimant FljB qui seront mélangées à un antigène donné et le tout administré par voie orale. Développer des nouveaux adjuvants pour cibler la voie orale en particulier présente un grand intérêt

notamment à cause de la tolérance immunitaire, obstacle au développement d'une réponse immunitaire optimale obtenue avec un vaccin. Enfin, ces deux derniers objectifs permettront de démontrer les effets adjuvants de la flagelline par deux modes d'administration soit intracellulaire avec les AdV soit extracellulaire avec le vecteur plante.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Rotavirus

1.1.1 Caractéristiques générales

Les rotavirus forment un des genres de la famille des *Reoviridae*. Identifiés pour la première fois par Ruth Bishop en 1973, ces virus tirent leur nom de l'apparence en forme de roue des particules virales observées en microscopie électronique (Parashar et al., 1998). Onze segments d'acide ribonucléique double-brin (ARNdb) composent leur génome. Chacun d'eux code pour une seule protéine sauf le onzième qui code pour deux par épissage alternatif (Pesavento et al., 2006). Six protéines ont un rôle structural (VP) et six autres, non structurales (NSP), participent à la réplication du virus dans la cellule hôte. Le génome, les protéines et structure du virion sont illustrés dans la figure 1.1. Plus précisément, le génome des rotavirus est encapsidé dans trois couches protéiques concentriques de forme icosaédrique et de diamètre de 1000 Å, le protégeant ainsi des enzymes digestives du système gastro-intestinal (Prasad et al., 2001). Les récentes techniques de cryomicroscopie électronique et cristallographie aux rayons X ont permis d'établir un modèle d'architecture des virions matures présenté dans la figure 1.1 (Dormitzer et al., 2004; Mathieu et al., 2001). Chacun des segments du génome est enroulé autour d'un complexe transcriptionnel composé de VP1 (ARN-polymérase) et VP3 (guanylyltransférase et méthyltransférase). Ce complexe est lui-même ancré dans la première capside formée par VP2. Celle-ci est entourée par une couche intermédiaire

de trimères de VP6, elle-même couverte par la capside externe du virion composée majoritairement par une matrice de trimères de VP7 parsemée de dimères de VP4 formant des spicules. Des canaux traversant chacune des trois couches et principalement les deux couches protéiques internes permettent le passage d'eau, d'électrolytes, et de substrats à l'intérieur et à l'extérieur de la capside (Lawton et al., 2000; Mathieu et al., 2001; Trask et Dormitzer, 2006).

Les trois mécanismes à l'origine de la grande variabilité génétique des rotavirus sont, par ordre d'importance, les mutations ponctuelles (retrouvées chez la plupart des virus à ARN), les réassortiments génétiques lors de co-infections [liés à la nature segmentée du génome et analogues à ceux du virus de la grippe (Ghosh et Kobayashi, 2011; Ramig, 1997)], et les réarrangements génomiques (mécanisme différent d'une recombinaison génétique et très rare mis en évidence lors des infections chroniques survenant chez les enfants immunodéprimés) (Palombo et al., 1998; Pesavento et al., 2006; Ramig, 1997; Rodriguez-Castillo et al., 2006).

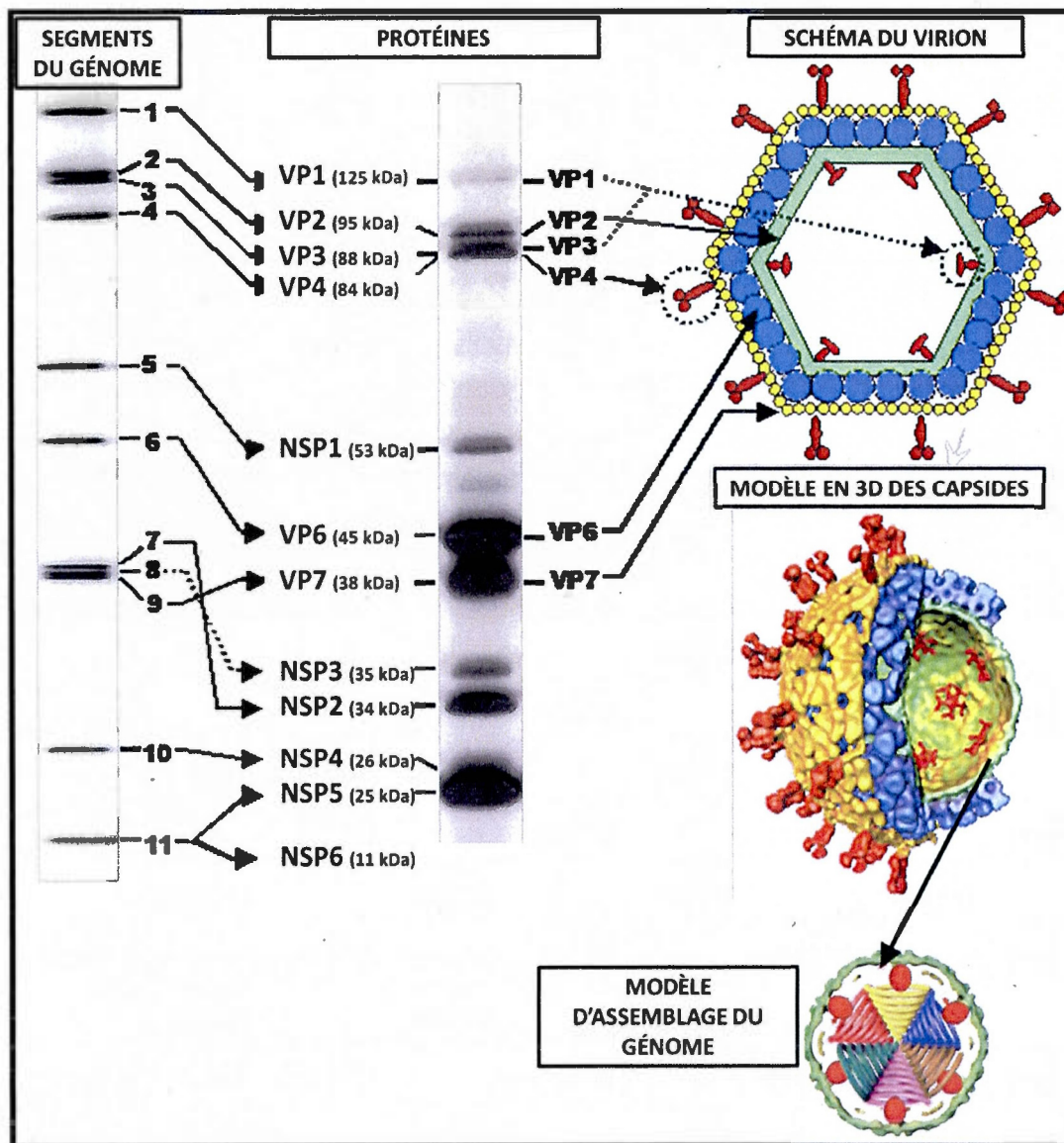


Figure 1.1 : Segments du génome, protéines du rotavirus et modèle de la structure du virion.

Cette figure a été adaptée de plusieurs publications (Gray et Desselberger, 2000; Pesavento et al., 2006). Les 11 segments du génome de la souche SA11 du rotavirus ont été séparés par électrophorèse. Chaque segment code pour une protéine sauf le onzième qui code NSP5 et NSP6. Ces protéines ont été mises en évidence par SDS-PAGE (excepté NSP6). Un schéma représentant les protéines structurales (VP) a été réalisé pour montrer la structure des trois capsides concentriques. Finalement un modèle en trois dimensions est présenté en gardant les mêmes couleurs que dans le schéma pour situer chacune des protéines. Le génome entouré de la première capside a aussi été modélisé.

1.1.2 Classification

La classification des rotavirus reflète leur grande diversité antigénique et génotypique. Tout d'abord, les variations antigéniques de VP6 permettent de classer les rotavirus en sept groupes A à G. Ensuite, au sein de ces groupes, des sérotypes sont identifiés par un système de typage binomial G-P basé respectivement sur la séroneutralisation de VP7 (G pour glycosylée) et VP4 (P parce qu'elle est sensible à l'activité protéolytique de la trypsine) (Hoshino et Kapikian, 1996). À ce jour, 14 sérotypes relatifs à VP7 et 19 sérotypes relatifs à VP4 ont été identifiés. Enfin, les sérotypes G et P correspondent à des génotypes distincts. Contrairement aux génotypes G, les génotypes P n'ont pas tous été caractérisés. Ces derniers sont aussi précisés dans la classification des rotavirus. À titre d'exemple, la souche humaine Wa du groupe A est de type G1P1A[8] (séro-génotype G1, sérotype P1A, génotype P8). Souvent seul le génotype P est indiqué.

1.1.3 Impact des rotaviroses sur les populations humaines

Les rotavirus du groupe A sont reconnus par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme les agents pathogènes causant les plus fréquentes et graves maladies diarrhéiques chez les nourrissons et les enfants de moins de 5 ans et ceci partout dans le monde (Santos et Hoshino, 2005). En 2007, il a été estimé que chaque année les rotavirus étaient responsables à eux seuls de 140 millions de cas de diarrhée dont 25 millions nécessitent une consultation médicale, 2 millions une hospitalisation pour traiter la déshydratation sévère et 610 000 cas conduisent à un décès principalement dans les pays en voie de développement (Parashar et al., 2006; Santos et Hoshino, 2005; World-Health-Organization, 2007). Dans les pays occidentaux, les coûts annuels des hospitalisations sont très lourds; en 2006 aux États-Unis ces coûts se chiffraient à environ un milliard de dollars (Charles et al., 2006). Ce bilan a justifié le besoin de vaccins pour prévenir les infections car aucun traitement antiviral n'est

actuellement disponible (World-Health-Organization, 2007). De plus, l'amélioration de l'hygiène et systèmes sanitaires a eu peu d'impact pour prévenir les infections (Parashar et Glass, 2006; Soares-Weiser et al., 2010). Les taux de mortalité dus aux rotavirus sont représentés dans la figure 1.2 pour l'année 2008.

Après la mise en marché et utilisation de deux vaccins en 2006 aux États-Unis, Amérique latine et Europe, le bilan des rotavirus était estimé en 2009 à 500 000 décès et environ 2 millions d'hospitalisations (Jiang et al., 2010). Des études montrant l'efficacité relative de ces vaccins (en terme de diminution du nombre de décès) dans ces zones géographiques ont conduit l'OMS en 2009 à en recommander l'utilisation dans les pays en développement, notamment en Afrique et en Asie où le bilan des rotavirus est le plus lourd (Grimprel, 2010; Jiang et al., 2010; Munos et al., 2010; Soares-Weiser et al., 2012; World-Health-Organization, 2012).

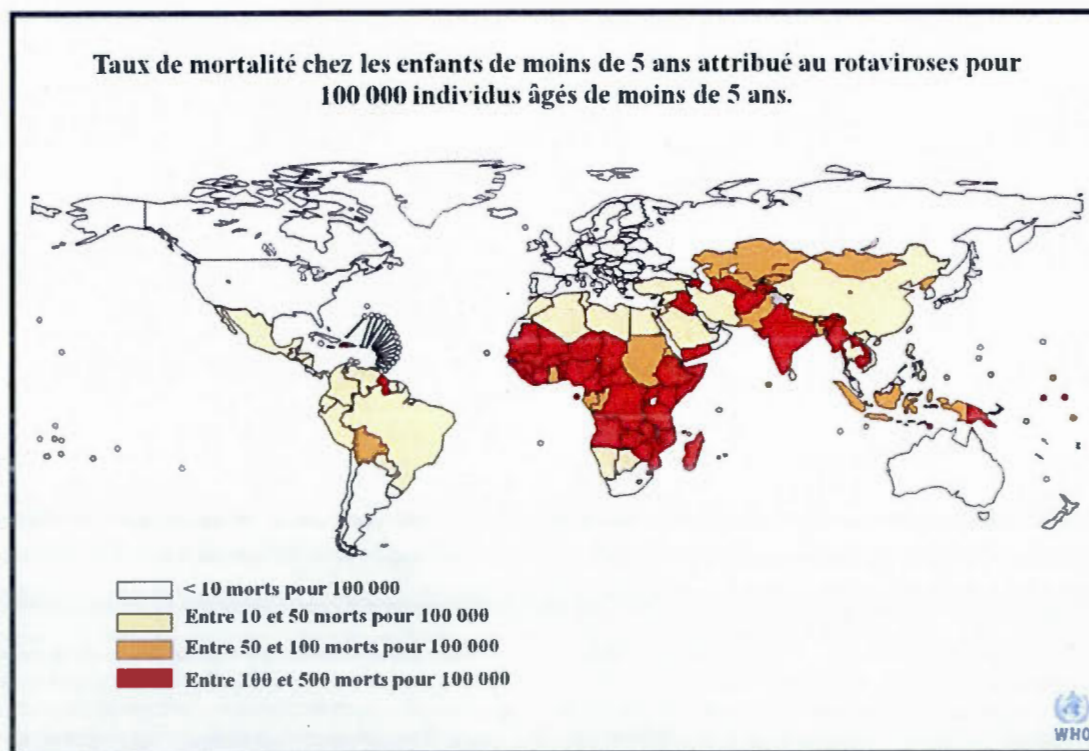


Figure 1.2 : Représentation des taux de mortalité due aux rotavirus dans le monde en 2008, d'après l'OMS.

Figure adaptée de (World-Health-Organization, 2012).

1.1.4 Prévalence

Il est important de considérer la distribution globale des sérotypes de rotavirus infectant les humains afin d'établir la meilleure stratégie vaccinale. C'est pourquoi un programme international de surveillance a été mis en place et a permis de compiler des informations sur les souches recueillies de 1989 jusqu'en 2004 (Santos et Hoshino, 2005). Selon les données recueillies, 90% des rotaviroses humaines sont causées par cinq sérotypes appartenant tous au groupe A, bien qu'il existe une grande diversité de souches virales. Plus précisément ces sérotypes sont G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] et G9P[8]. Le type G1P[8] représente à lui seul 64,7% des cas. La distribution des souches de type P est plus stable que les souches de type G. Le génotype P[8] est prédominant et induit 80% des infections mondiales. De plus, des fluctuations géographiques et temporelles importantes ont été observées entre les épidémies induites par les différentes souches. Par exemple le type G1P[8] est prévalent à 70% en Amérique du Nord, Europe et Océanie mais seulement à 30% en Afrique (Santos et Hoshino, 2005; 2007). Le génotype P[8] est quant à lui prévalent à 50% en Afrique, 70% en Asie et à 90% dans les pays occidentaux. Il est intéressant de souligner l'apparition de souches nouvelles comme, par exemple, celles des groupes B et C responsables en faibles proportions des infections localisées en Chine et en Inde (Barman et al., 2006). Des associations G/P inhabituelles ont été caractérisées et sont issues de réassortiments entre souches humaine et animale; le sérotype G5 est par exemple issu d'une souche porcine (Parez, 2007; Santos et Hoshino, 2005). En conclusion, la distribution des sérotypes au cours du temps par la persistance de la forte prévalence des sérotypes G1 ainsi que par la diversité limitée de VP4 supporte l'hypothèse que le système immunitaire n'exerce pas une pression sélective suffisante contre les rotavirus pour favoriser l'apparition de sérotypes génétiquement éloignés (qui fait suite généralement à des modifications génétiques majeures) (Franco et al., 2006; Santos et Hoshino, 2005).

De nouvelles études épidémiologiques après l'introduction des vaccins en 2006 seraient intéressantes pour étudier l'impact sur la persistance des souches ou bien l'apparition de nouvelles souches. Des résultats en Europe, États-Unis, Amérique latine et Australie montrent un début vers le déclin de certaines souches (Yen et al., 2011). Cependant c'est en Asie et en Afrique que réside le plus grand défi de santé publique à relever pour ces vaccins principalement pour diminuer le bilan des décès et des hospitalisations. La vaccination n'est pas encore intégrée dans des programmes de vaccination de routine dans la plupart des pays de ces régions du monde (World-Health-Organization, 2012).

1.1.5 Pathologies

Diverses études cliniques témoignent de la virulence des rotavirus (Estes et al., 2001; Leung et al., 2005; Parashar et al., 2006). Les enfants âgés de plus de 6 mois jusqu'à 5 ans développent une pathologie sévère tandis que les nouveaux-nés ont une pathologie modérée voire asymptomatique. Les adultes infectés par contact avec des enfants infectés sont asymptomatiques et représentent un réservoir majeur des rotavirus dans les populations (Leung et al., 2005).

Très stables dans l'environnement (Caballero et al., 2004), moins de dix particules virales transmises par voie féco-orale déclenchent la maladie chez le jeune enfant. Porté à la bouche, le virus est acheminé jusqu'à l'intestin grêle où il infecte les entérocytes différenciés des villosités localisées dans le jéjunum du petit intestin. L'infection a plusieurs conséquences pathologiques (Ciarlet et Estes, 2001; Shaw, 2006). Premièrement, l'épithélium intestinal desquame suite à la réplication virale et à l'apoptose des cellules épithéliales infectées (mise en évidence chez la souris) (Boshuizen et al., 2003). Cela seul compte pour beaucoup dans la perte de fluide dans des épisodes de diarrhée et de vomissements débutant de un à trois jours après l'infection. La diarrhée assure la propagation de la maladie par les 10^8 à 10^{10} virions

par millilitre (ml) de matières fécales liquides excrétées par un enfant malade. Un second mécanisme impliqué dans la diarrhée a été mis au jour chez les rongeurs. Un des gènes du rotavirus code une protéine qui ouvre des canaux à ions chlore à la surface des cellules et qui est sécrétée par les cellules épithéliales dans la lumière de l'intestin (Bugarcic et Taylor, 2006). Cette protéine non structurale, NSP4, peut agir seule sur des cellules non infectées ce qui amplifie la perte de fluide et d'électrolytes du tissu intestinal. Cela peut avoir lieu avant même que l'épithélium ne soit endommagé suite à la multiplication du virus. Cette fonction est similaire à celle des entérotoxines bactériennes telle que la toxine du choléra (CT) et de *Shigella* (Estes et Morris, 1999). D'autre part, le médicament Racecadotril peut limiter les diarrhées. Il est connu pour inhiber les sécrétions intestinales, ce qui appuie l'implication du virus dans la stimulation du système nerveux entérique (Halaihel et al., 2000; Salazar-Lindo et al., 2000). La destruction de l'épithélium entraîne non seulement une perte de fluide directe, mais aussi une inflammation aiguë de l'intestin, de la fièvre et une diminution de l'efficacité digestive et de l'absorption de l'eau et des nutriments. Ces symptômes durent de quatre à huit jours et si la déshydratation subséquente est majeure, elle conduit à un état de choc et parfois à la mort (Leung et al., 2005; Parashar et al., 2006; Shaw, 2006).

Chez les personnes immunodéprimées, les infections à rotavirus ne sont pas toujours associées à une augmentation des diarrhées graves ou à des maladies systémiques. Cependant l'excrétion du virus peut durer plus longtemps chez ces personnes. Par contre, l'infection peut se traduire par une gastroentérite à rotavirus sévère, durable et même mortelle chez les individus immunodéprimés en raison d'une immunodéficiences congénitale ou d'une transplantation de moelle osseuse ou d'un organe solide (World-Health-Organization, 2007).

Malgré des associations répétées des rotaviroses avec des pathologies systémiques (maladies respiratoires et syndromes neurologiques), le concept que le

virus restait confiné dans les entérocytes a prévalu depuis sa découverte il y a 35 ans jusqu'en 2003 (Blutt et Conner, 2007; Iturriza-Gomara et al., 2002). Ce dogme a été mis à mal par de récentes études mettant en évidence la présence d'antigènes et d'ARN viraux non seulement dans le sérum d'enfants infectés (Blutt et al., 2003; Ray et al., 2006) mais aussi dans le liquide céphalo-rachidien d'enfants présentant des gastro-entérites à rotavirus en même temps que des méningites (Dickey et al., 2009; Medici et al., 2011). La majorité des chercheurs s'accordent aujourd'hui pour dire que ces dernières observations indiquent une virémie. Le virus infectieux a aussi été détecté dans le sérum et dans des tissus extra-intestinaux (sang, rate, reins, sécrétions respiratoires ou liquide céphalo-rachidien) dans des modèles expérimentaux de la souris (Blutt et al., 2006a; Fenaux et al., 2006), du rat (Crawford et al., 2006), des porcs gnotobiotiques (Azevedo et al., 2005) et des primates (Zhao et al., 2005). Le tropisme du virus au delà de la muqueuse intestinale est inconnu et soulève de nombreuses interrogations sur les pathologies systémiques et les séquelles que pourrait causer le rotavirus (Blutt et Conner, 2007; Ramig, 2004). Des études chez la souris ont montré que les protéines NSP3 et VP6 seraient impliquées dans les mécanismes permettant au virus d'être disséminé dans l'organisme (Mossel et Ramig, 2002; Mossel et Ramig, 2003). De plus, plusieurs maladies chez l'enfant ont été associées aux gastroentérites à rotavirus, comme par exemples des méningites (Dickey et al., 2009; Medici et al., 2011), ou bien des cas d'atrésie des voies biliaires (Feng et al., 2011). Pour cette dernière pathologie, il a été montré que les rotavirus du groupe A est la cause de l'obstruction des voies biliaires qui, lorsque non traitée, peut conduire à la cirrhose biliaire et au décès de l'enfant dans les premières années de vie (Hertel et Estes, 2012).

1.1.6 Cycle de réplication du rotavirus

Lorsque les virions arrivent dans la lumière du jéjunum du petit intestin, la protéine de surface VP4 subit d'abord des changements de conformation à cause du

pH élevé. Ensuite le clivage par la trypsine pancréatique de cette protéine en VP8* et VP5* représentent la première étape dans l'attachement du virus aux cellules (Pesavento et al., 2005). Les fragments VP5* forment des homotrimères toujours ancrés dans la matrice de VP7, tandis que les fragments VP8* restent associés avec le virion (Monnier et al., 2006). Il a été montré que pour les souches rotavirales animales, VP8* initie l'attachement aux cellules cibles par sa réaction avec l'acide sialique (Dormitzer et al., 2002). Dans le cas des souches humaines, cette première étape est absente et le virus se lie par les motifs DGE et IDA de VP5* (Graham et al., 2006) aux intégrines $\alpha v \beta 3$ (Guerrero et al., 2000), $\alpha 4 \beta 7$, $\alpha 4 \beta 1$ et $\alpha 2 \beta 1$ (Fleming et al., 2007; Pesavento et al., 2006) des cellules cibles. Il n'existe pas encore de modèle défini pour l'entrée du virus dans la cellule, mais une étude récente semble appuyer que le rotavirus entre par endocytose (Wolf et al., 2011). Les propriétés hydrophobes de VP5* semblent aussi nécessaires pour les interactions avec la membrane plasmique lors de l'entrée du virus (Kim et al., 2010).

Pour entrer dans la cellule, la dissociation des trimères de VP7 et donc la décapsidation semble nécessaire (Aoki et al., 2011). En entrant dans la cellule le virion perd donc la capside externe par un mécanisme dépendant du faible niveau d'ions calcium (Ca^{2+}) dans le cytoplasme cellulaire qui induit la dissociation des trimères de VP7 (Benureau et al., 2005). La transcription des segments d'ARNdb est alors activée par VP1 à l'intérieur même de la particule virale qui demeure intacte pendant le processus (Valenzuela et al., 1991). VP3 assure la maturation de l'extrémité 5' des ARN messagers (ARNm) pour faciliter leur traduction par la machinerie cellulaire (Chen et al., 1999). Ces ARNm sortent de la particule virale par les canaux aqueux présents dans les couches de VP2 et VP6 et se retrouvent dans le cytoplasme (Lawton et al., 2000). Les ARN transcrits à partir du brin à polarité positive sont pris en charge par NSP3 qui les transporte dans les viroplasmes périnucléaires (inclusions où s'assemblent les virions à deux capsides). Même si

NSP3 n'est pas nécessaire à la traduction des ARNm viraux, cette protéine permet d'inhiber la synthèse protéique de la cellule hôte favorisant ainsi la synthèse protéique virale (Montero et al., 2006). Dans les viroplasmes, les ARNm sont d'une part traduits et d'autre part servent de base pour produire des brins à polarité négative qui formeront les ARNdb du génome des futurs virions (Pesavento et al., 2006; Silvestri et al., 2004). La protéine NSP1 possède elle aussi un domaine de liaison à l'ARN et bien que non indispensable, elle semble être impliquée dans des mécanismes qui facilitent l'assemblage des nouveaux virions (Chung et McCrae, 2011; Silvestri et al., 2004).

Ce sont NSP2 et NSP5 qui initient par la suite l'association des onze segments d'ARNdb nouvellement formés avec leurs complexes VP1-VP3-VP2 respectifs formant ainsi la première capsid. NSP6, protéine retrouvée dans le viroplasma, possède elle aussi un domaine de liaison à l'ARN et est connue pour interagir avec NSP5. C'est pourquoi cette protéine semble être impliquée dans la formation des virions (Taraporewala et Patton, 2004). Pourtant certaines souches de rotavirus du groupe A et toutes les souches du groupe C n'exprime pas NSP6. Cela laisse sous-entendre que cette protéine n'est pas nécessaire à l'assemblage des virions (Taraporewala et Patton, 2004; Torres-Vega et al., 2000). Lorsque la première capsid est constituée, NSP2 et NSP5 permettent aussi la formation de la deuxième capsid constituée par VP6. Les particules virales à deux capsides bourgeonnent du viroplasma dans le réticulum endoplasmique où est exprimée et glycosylée VP7 (Mirazimi et Svensson, 2000). La liaison entre VP6 et VP7 est alors assurée par NSP4 pour former la couche externe du virion. Finalement l'association de VP4 à cette capsid s'effectue dans le cytoplasme ou bien à la membrane cytoplasmique lors du relargage des virions dans l'espace intercellulaire ce qui entraîne la mort de la cellule hôte (Pesavento et al., 2006). Les fonctions des douze protéines du rotavirus et leurs implications dans le cycle viral sont résumées dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 : Fonctions des différentes protéines du rotavirus dans le cycle de réplication virale

Protéines du rotavirus	Fonctions connues (Montero et al., 2006; Pesavento et al., 2006; Silvestri et al., 2004; Taraporewala et Patton, 2004)
<i>Protéines structurales</i>	
VP1	ARN-polymérase, liaison à l'ARN, interaction avec VP2 et VP3.
VP2	Formation de la première capside, liaison à l'ARN viral et interaction avec VP1.
VP3	Guanylyltransférase et méthyltransférase, maturation des ARNm, liaison à l'ARN viral et interaction avec VP1.
VP4 (clivée en VP5* et VP8*)	Attachement à la cellule et formation de la troisième capside.
VP6	Formation de la deuxième capside.
VP7	Formation de la troisième capside et liaison aux ions calcium pour la décapsidation.
<i>Protéines non-structurales</i>	
NSP1	Liaison à l'ARN viral et antagoniste de la réponse en interféron de type I.
NSP2	Réplication et emballage du génome.
NSP3	Liaison à l'ARN viral, transport des ARNm au viroplasma, inhibition de la synthèse protéique cellulaire.
NSP4	Morphogénèse du virion et entérotoxine.
NSP5	Interactions avec NSP2, liaison à l'ARN viral, assemblage du génome et morphogénèse des deux premières capsides.
NSP6	Interaction avec NSP5, liaison à l'ARN viral et formation des virions.

1.1.7 Réponse immunitaire pendant l'infection

Les modèles animaux expérimentaux ont permis d'approfondir les connaissances recueillies pendant les infections humaines et d'établir un modèle de l'immunité contre le rotavirus. Chacun d'eux offre des avantages et des inconvénients mais aucun ne reproduit parfaitement l'infection et la pathologie humaine (Franco et al., 2006); ces informations sont détaillées dans le tableau 1.2 ci-dessous.

Tableau 1.2 : Comparaison de l'infection par le rotavirus chez les jeunes enfants et chez différents modèles animaux.

	Homme (Estes et al., 2001)	Modèles expérimentaux			Porc (Saif et al., 1997; Saif et al., 1996; Ward et al., 1996)
		Souris (Feng et al., 1997; Ward et al., 1990)	Rat (Ciarlet et al., 2002)		
Âge	Enfants de moins de 5 ans	Nouveaux-nés âgés jusqu'à 15 jours	Adultes	Nouveaux-nés âgés au maximum de 21 jours	Nouveaux-nés (gnotobiotiques) âgés de 3 à 5 jours
Infection Homologue Et souche rotavirale	Souches humaines du groupe A, B et C	Souche murine EDIM	Souche murine EDIM	Souche murine EDIM	Non applicable (N/A)
Infection Hétérologue Et souche rotavirale	Non ou asymptomatique, peut donner lieu à des réassortiments génétiques	(Souche simienne SA-11 mais n'induit pas de pathologie) Souche simienne RRV	Non	Souches humaines Wa et HAL1166. Souche simienne RRV	Souche humaine Wa
Titre viral en FFU (pour focus-forming units)	10 particules virales	2 x 10 ³ FFU		2.2 x 10 ⁶ FFU	10 ⁵ FFU
Incubation	1 à 3 jours	2 jours	3 jours	1 jour	
Diarrhées	Sévères pendant 4 à 8 jours	Oui	Non	Oui dure jusqu'à 10 jours	dure 4 jours
Antigènes rotaviraux dans les fèces	Pendant des mois post-infection	A partir de 3 jours post-infection Pendant 6 jours	A partir de 3 jours post-infection Pendant 6 jours	Plus de dix jours post-infection	6 jours
Virémie (Blutt et Conner, 2007)	Antigènes rotaviraux dans le sérum	Oui	N/D	Oui	Oui
Immunité stérile	Non	Non applicable (N/A)		Non applicable (N/A)	Oui
Limites du modèle	Non applicable (N/A)	Modèle d'immunité passive Animaux non permissifs aux souches humaines	Pas de pathologie, l'infection est déterminée par la présence d'antigènes rotaviraux dans les fèces	Modèle d'immunité passive Adultes non permissifs aux virus hétérologues	Induction d'une immunité stérile

1.1.7.1 Immunité innée

1.1.7.1.1 Les récepteurs de l'immunité innée

Les pathogènes (virus, bactéries, protozoaires, levures) ont acquis des facteurs de virulence qui leur permettent de coloniser et parfois de causer des maladies chez leur hôte eucaryote et cela même face à une défense immunitaire robuste (Mogensen, 2009). Pour détecter et faire face rapidement à différents micro-organismes dont les pathogènes, l'hôte a développé certaines stratégies. Ainsi les cellules épithéliales, les monocytes, les cellules polymorphonucléaires et de nombreux autres types cellulaires expriment les récepteurs PRR (pour « Pattern Recognition Receptors ») qui permettent de détecter des pathogènes en se liant à des motifs moléculaires précis appelés PAMP (pour « Pathogen-Associated Molecular Patterns ») (Mogensen, 2009). Ces motifs sont très conservés, ce qui fait la force du système immunitaire inné. Les PRRs sont très importants dans la reconnaissance d'une grande variété de pathogènes. Ils comprennent les TLR (pour « Toll Like Receptors »), qui permettent la détection de PAMP dans le milieu extracellulaire, les NLR (pour « Nod-Like Receptors »), les RLR (pour « Retinoid acid-inducible gene I-Like Receptors ») et les détecteur d'ADN (« DNA sensors ») qui eux détectent les PAMPs dans le cytosol. Ces récepteurs sont schématisés avec leurs domaines principaux dans la figure 1.3.

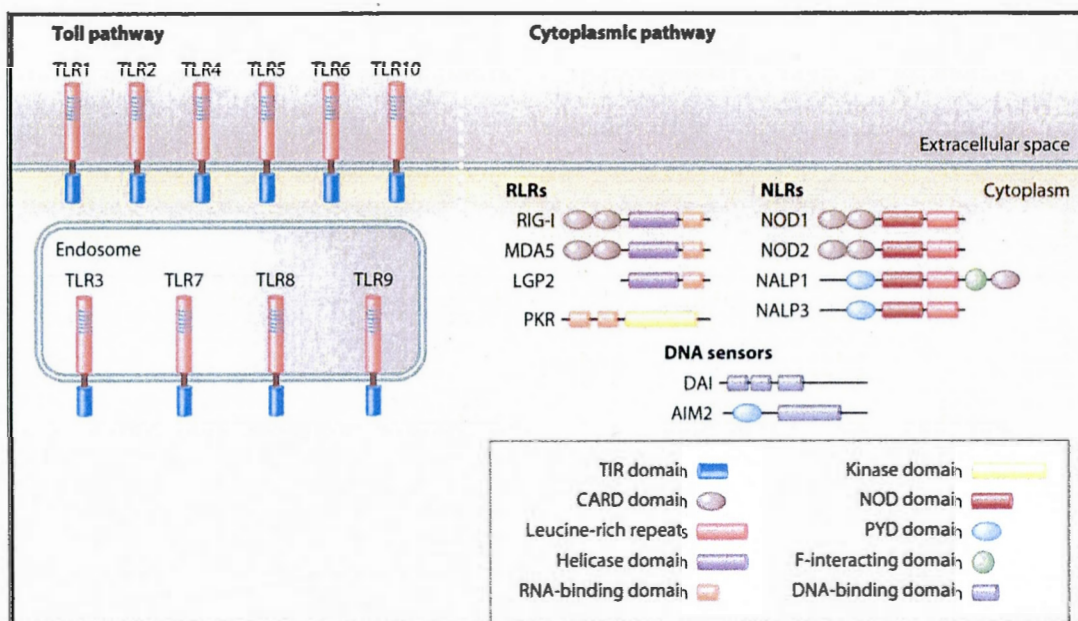


Figure 1.3 : Les différentes familles de PRR.

Les TLR peuvent se lier à des PAMPs lorsque ceux-ci sont dans le milieu extracellulaire ou dans les endosomes. Les RLR, NLR et DNA sensors peuvent se lier à des PAMPs dans le milieu intracellulaire. Les TLR se caractérisent par un domaine riche en leucine extracellulaire ou endosomal qui se lient aux PAMPs et un domaine TIR (pour «Toll/interleukin-1 receptor-like domain») intracellulaire qui active les voies de signalisation intracellulaire. Les NLR se caractérisent par leur domaine NOD (pour «nucleotide-binding oligomerization domain») et les RLR par leur domaine Hélicase et leur domaine de liaison à l'ARN. Pour finir, les détecteurs d'ADN ont un domaine de liaison à l'ADN.

Source : (Mogensen, 2009).

Il existe une grande variété de récepteurs pour une grande variété de pathogènes. Il est à noter qu'une certaine redondance dans la reconnaissance des pathogènes existe. En effet, certains récepteurs de différentes familles reconnaissent les mêmes PAMPs mais dans différents compartiments cellulaires comme indiqué dans la figure 1.4. L'engagement des PRR, de manière intracellulaire ou extracellulaire, active une cascade de réactions intracellulaires qui marque l'initiation de la réponse immunitaire innée.

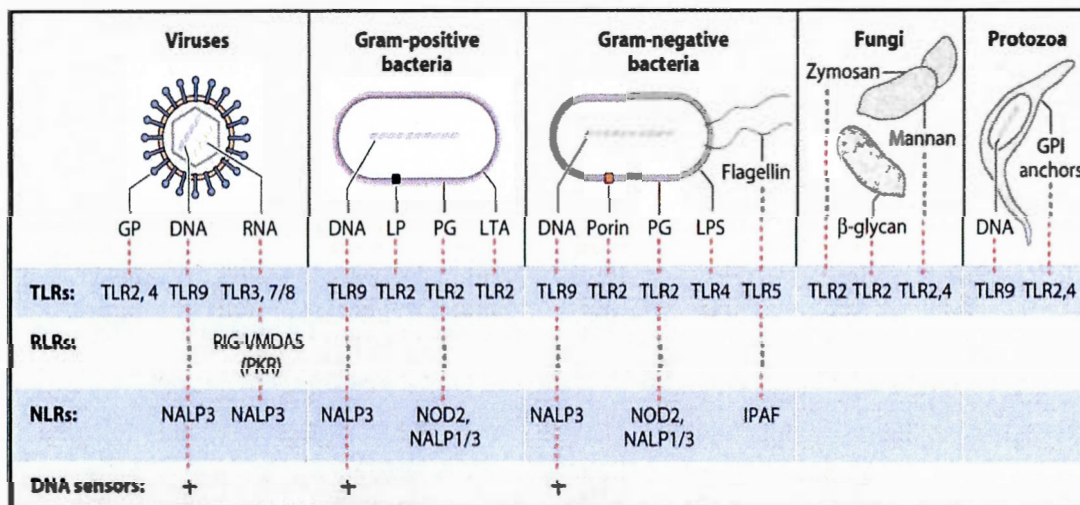


Figure 1.4 : Reconnaissance de PAMP de différents pathogènes.

Différentes familles de PRRs permettent de reconnaître des PAMPs appartenant à divers pathogènes. NOD (pour «nucleotide-binding oligomerization domain»); IPAF (pour «ICE-protease activating factor»); NALP (pour «NACHT-, LRR- and pyrin-domain-containing proteins»). Figure tirée de (Mogensen, 2009).

1.1.7.1.2 Immunité innée et rotavirus

Le TLR3, connu pour reconnaître l'ARNdb, est exprimé par les entérocytes et les cellules dendritiques. Il joue un rôle dans l'immunité innée antivirale (Matsumoto et al., 2003). Une étude *in vitro* a montré que l'ARNdb du rotavirus active les cellules dendritiques immatures dérivées de monocytes via le TLR3 exprimé intracellulairement dans les endosomes. Cette activation se traduit par la maturation des cellules dendritiques (surexpression de complexe majeur d'histocompatibilité de classe II -CMH II- et du CD86) et la production de cytokines de type Th1 (Interféron- γ) (Matsumoto et al., 2003). Chez des enfants ayant des diarrhées rotavirales aiguës, l'expression du TLR3 a été observée dans les monocytes périphériques du sang (Xu et al., 2007).

Pour faire face à cette réponse innée antivirale, le rotavirus, par l'intermédiaire de sa protéine NSP1, peut moduler la réponse en interféron de type I. Selon les souches et les types cellulaires, NSP1 peut conduire à la dégradation des facteurs de transcription activant l'expression des interférons de type I (Sherry, 2009). En

inhibant la réponse en interféron de type I, l'infection de la cellule par le rotavirus peut rester cachée vis-à-vis du système immunitaire.

D'autre part, les entérocytes infectés par le rotavirus sécrètent des chimiokines (CCL) et de l'interleukine 8 (IL-8) (Casola et al., 2002), ce qui permet le recrutement au site de l'infection de leucocytes qui expriment des récepteurs spécifiques (CCR) à ces chimiokines (Casola et al., 1998; Rollo et al., 1999). Les principaux leucocytes visés sont les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ résidents dans les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques (Feng et al., 2006). Plus précisément, le CCL25 recrute les LB exprimant le CCR9 et des immunoglobulines A (IgA) à leur surface (Feng et al., 2006). Après que les LB spécifiques se soient différenciés en plasmocytes, le CCL28 attire ces derniers qui expriment le CCR10 (Feng et al., 2006). Les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ sont quant à eux mobilisés et activés par la production d'IL-8, connue pour être pro-inflammatoire (Casola et al., 2002).

1.1.7.2 Immunité adaptative et rotavirus

Parallèlement, le rotavirus rentre en contact avec les cellules présentatrices d'antigènes suite à son entrée qui est facilitée par les cellules microplis (cellules M) au niveau des plaques de Peyer. D'autre part, il induit la production de plasmocytes qui restent confinés au compartiment intestinal et qui sécrètent des IgA polymériques (sIgA) dans la sous-muqueuse. Ces anticorps sont ensuite transportés dans la lumière intestinale à travers les entérocytes par transcytose et sont la première et la plus importante ligne de défense contre le rotavirus. Une étude chez le porc a démontré que la majorité des plasmocytes spécifiques aux antigènes du rotavirus est spécifique à VP6. VP4 en active environ 45%. VP2, VP7, NSP3 et NSP4 se retrouvent en ordre immunogénique décroissant (Chang et al., 2001). Les sIgA ont un effet antiviral par leur capacité d'exclusion [neutralisant le virus et empêchant l'infection des entérocytes *de novo* (Bouvet et Fischetti, 1999)] et possiblement d'expulsion [en se

fixant sur les particules virales en formation dans l'entérocytes pendant la transcytose et les entraînant dans la lumière intestinale (Burns et al., 1996)]. La neutralisation est assurée exclusivement par les sIgA anti-VP4 et VP7. Les sIgA anti-NSP4 semblent bloquer la diarrhée mais pas l'infection. L'expulsion du virus par les sIgA anti-VP6 a seulement été démontrée chez la souris (Franco et al., 2006). Des LB mémoires sont ensuite générés. Ils possèdent le récepteur CCR9 et l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ qui leur permettent de circuler dans le sang et de revenir aux plaques de Peyer (Franco et al., 2006; Weitkamp et al., 2005; Williams et al., 1998).

Comme le rotavirus échappe à la muqueuse intestinale, il est postulé que ses antigènes se retrouvent dans le compartiment systémique et stimulent des LB mémoires dans la rate ayant des récepteurs CD62L+ leur permettant de circuler dans le sang et de revenir à la rate (Franco et al., 2006; Youngman et al., 2002). Ils induisent aussi la production de plasmocytes résidant dans la moelle osseuse et sécrétant la majorité des IgA et IgG monomériques qui circuleront dans le sérum et neutraliseront les virions. De manière surprenante et mal comprise, les anticorps peuvent « passer » d'un compartiment à l'autre (du sérum à la muqueuse ou inversement) (Bouvet et Fischetti, 1999; Jiang et al., 2002). Ce mécanisme a été observé chez des souris déficientes en IgA et dont les IgG assuraient une protection au niveau intestinal (O'Neal et al., 2000).

Malgré l'importance de la réponse humorale contrôlée par les lymphocytes T auxiliaires de type 2 (Th2), une réponse cellulaire contrôlée par les lymphocytes T auxiliaires de type 1 (Th1) existe bien. Lorsque les antigènes du rotavirus sont pris en charge par les cellules M et aussi mis en contact avec les cellules dendritiques, ces dernières migrent vers les centres germinatifs et organes lymphoïdes secondaires et présentent les peptides rotaviraux par leur CMH II aux lymphocytes T CD4+ naïfs (Narvaez et al., 2005). Une fois activées, ces cellules vont à leur tour stimuler et déclencher la différenciation d'autres lymphocytes par la sécrétion de cytokines. Une

étude du profil de cytokines chez le porc néonatal gnotobiotique a montré que dans un premier temps ce sont des cytokines de type Th1 (IL-12, INF γ) qui sont sécrétées au niveau systémique (Azevedo et al., 2006; Vancott et al., 2003). L'INF γ est aussi sécrété au niveau intestinal mais il est rapidement contrebalancé par l'IL-10 et l'IL-4 (réponse Th2) ce qui permettrait d'éviter une inflammation trop forte de la muqueuse intestinale et des séquelles subséquentes (Azevedo et al., 2006).

Au niveau de la réponse cytotoxique, il a été montré chez la souris que VP7, VP6, VP3 et NSP1 ont des épitopes ciblés par des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (LTc) spécifiques (Franco et al., 1993; Heath et al., 1997; Jaimes et al., 2005). Encore chez la souris, VP7 et VP6 possèdent les épitopes cytotoxiques immunodominants (restreints à l'haplotype H-2^b) ciblés au niveau systémique et mucosal (Jaimes et al., 2005). Dans le cas de VP7 ces épitopes sont conservés entre différents sérotypes (Offit et Dudzik, 1988) et groupes (Jaimes et al., 2005) et, dans le cadre de la virémie, permettraient l'élimination de cellules infectées au niveau systémique (Jaimes et al., 2005). Pour finir, il a été observé qu'en absence de lymphocytes T, le virus pouvait persister à très faible niveau chez la souris (Franco et Greenberg, 1997).

1.1.7.3 Immunité protectrice et corrélat de protection

Les études chez différents modèles animaux et chez les jeunes enfants ont mis en évidence l'importance de la réponse Th2 dans la résolution de la première infection (Feng et al., 1997). Les anticorps neutralisants, les anticorps non-neutralisants mais spécifiques au rotavirus, la réponse à médiation cellulaire ont tous été proposés comme corrélats de protection (Franco et al., 2006; Plotkin, 2010). Cependant ce sont les sIgA neutralisants dirigés contre VP7 et VP4 qui protégeront contre une réinfection directement au site de l'infection (Coste et al., 2000; Franco et al., 2006; Ward, 2003). Les séquences sur les protéines VP7 et VP4 des épitopes connus pour permettre de générer des anticorps neutralisants sont listées dans le

tableau A1 en annexe de cette thèse. Jusqu'à 4 mois après l'infection, la mesure des IgA totaux dans le sérum et spécifiques du rotavirus reflète le niveau de sIgA intestinaux. La mesure des IgA du sérum ainsi que leur capacité neutralisante du rotavirus sont considérées aujourd'hui comme le meilleur, même si imparfait, marqueur de la protection contre une infection rotavirale (Franco et al., 2006). Chez les jeunes enfants, la séroconversion des anticorps neutralisants a été utilisée comme corrélat de protection pour évaluer l'immunogénicité des vaccins Rotarix® et Rotateq® en phase III d'essai clinique (Franco et al., 2006; Vesikari et al., 2006). Cependant il faut souligner que ce corrélat de protection est limité par le manque de connaissances sur la virémie ainsi que sur l'influence de l'immunité maternelle (Blutt et Conner, 2007; Franco et al., 2006). Il a été montré que chez les porcelets, les anticorps maternels transmis par allaitement pouvaient moduler à la hausse ou à la baisse le titre d'anticorps chez des porcelets vaccinés et empêcher l'établissement d'une mémoire immunologique (Nguyen et al., 2006a; Nguyen et al., 2006b; Parreno et al., 1999). De plus, même si la réponse des LB chez les jeunes enfants et les adultes partage les mêmes épitopes immunodominants (Weitkamp et al., 2003), la maturation du récepteur des cellules B (BCR) les reconnaissant est différente. Ce dernier est connu comme étant de plus grande affinité pour les antigènes rotaviraux chez les adultes due à un mécanisme d'hypermutation somatique dans la séquence codant pour ce récepteur (Weitkamp et al., 2006).

1.2 Vaccins anti-rotavirus

1.2.1 Généralités sur les vaccins

1.2.1.1 Historique de la vaccination

Un vaccin est une préparation antigénique qui a pour but d'induire chez le sujet vacciné une réponse immunitaire spécifique à un agent pathogène et capable de protéger ce sujet contre l'infection naturelle ou d'en atténuer les conséquences. Le mot «vaccination» provient du mot latin «*vacca*» qui signifie vache et du mot «*vaccine*» qui désigne le virus de la variole des vaches. Il a été employé après la découverte d'Edward Jenner qui a démontré en 1789 que l'inoculation la vaccine à des enfants les protégeait contre une inoculation ultérieure avec le virus de la variole. Cette découverte a non seulement conduit à l'éradication de la variole au XXème siècle mais a aussi donné appui à l'idée qu'une protection contre les maladies infectieuses pouvait être délibérément acquise (Plotkin, 2005). C'est au XIXème siècle que Louis Pasteur a établi le principe scientifique de la vaccination et de l'atténuation des pathogènes avec ses travaux sur le choléra aviaire, la rage et la maladie du charbon (anthrax). Il a pu démontrer que la virulence des pathogènes pouvait être atténuée par des stress environnementaux comme la haute température, l'oxygène ou bien des produits chimiques (Plotkin, 2005). Au XXème siècle, l'atténuation des pathogènes a ensuite été obtenue par des passages en série sur milieu artificiel comme l'ont démontré Calmette et Guérin avec *Mycobacterium bovis* et le Bacille Calmette-Guérin (BCG), ou bien grâce à des passages chez les animaux et à l'usage des œufs embryonnés toujours d'actualité aujourd'hui avec les vaccins anti-grippe (Plotkin, 2009; Plotkin et Plotkin, 2011). En 1948, la maîtrise de la culture cellulaire a rendu possible la culture de virus *in vitro* ainsi qu'une nouvelle technique d'atténuation de la virulence de ces virus. Dès lors de nombreux vaccins atténués vivants ont vu le jour comme par exemple ceux contre la poliomyélite (vaccin oral

contre la polio d'Albert Sabin), la rougeole, la rubéole, la grippe ou le rotavirus (Plotkin, 2005). Le développement d'une autre technique a permis d'élargir encore les possibilités de développer des vaccins atténués vivants contre les virus à génome ARN segmenté. Cette technologie est basée sur leur capacité à échanger des segments de leur génome lors de co-infections avec plusieurs souches. Ces réassortiments génétiques ont pu être imités en culture cellulaire et ont permis d'élaborer des vaccins contre la grippe et le rotavirus (Plotkin, 2005; Shaw, 2006). Les principaux vaccins atténués vivants élaborés au cours de l'histoire, les stratégies employées pour les obtenir et les dates de leur disponibilité sont listés dans le tableau 1.3.

Tableau 1.3 : Historique des vaccins atténués vivants

Stratégie et technologie employée	Date	Vaccin ou cible
Usage de virus animaux	1798	Variole
Atténuation chimique	1881	Anthrax
	1885	Rage
Atténuation par passage <i>in vitro</i>	1927	BCG
	1935	Fièvre jaune
Atténuation par passage en culture cellulaire	1962	Vaccin oral contre la poliomyélite
	1963	Rougeole
	1969	Rubéole
	1971	Adénovirus
	1995	Varicelle
	2003	Grippe
	2006	Rotavirus (Rotarix®)
Usage de réassortiments génétiques	2003	Grippe
	2006	Rotavirus (Rotateq®)

Tableau modifié de (Plotkin, 2005).

Les progrès en biologie moléculaire et en génie génétique ont aussi contribué à l'avancée de la vaccinologie avec l'utilisation de virus ou bactéries recombinants qui peuvent servir de vaccins vivants atténués ou bien de vecteurs vaccinaux (Plotkin, 2005). Quelques exemples de vecteurs vaccinaux les plus utilisés sont listés dans le tableau 1.4. Le génie génétique a permis de modifier ces micro-organismes pour supprimer leur pathogénicité.

Parallèlement, l'idée d'utiliser des micro-organismes entiers mais inactivés comme moyen de développer des vaccins a été exploitée dès le XIXème siècle, peu après les travaux de Louis Pasteur (Plotkin, 2005). Ces pathogènes inactivés ont permis de lutter contre plusieurs maladies mortelles comme la peste, le choléra et le typhus, cela dès la fin du XIXème siècle. Dans la première moitié du XXème siècle, de tels vaccins ont aussi été développés contre la poliomyélite (vaccin de Jonas Salk en 1955) et la grippe (1938). Plus récemment, en 1995, un vaccin inactivé contre l'hépatite A a été mis sur le marché (Plotkin, 2009; Plotkin et Plotkin, 2011).

Tableau 1.4 : Quelques exemples de virus et bactéries les plus utilisés comme vecteurs vaccinaux

Virus	Bactéries
Poxvirus	<u>Bactéries pathogènes appartenant aux genres :</u>
Adénovirus	<i>Salmonella</i>
Virus de la stomatite vésiculaire (VSV)	<i>Legionella</i>
Virus associé à l'adénovirus (AAV)	
Alphavirus	<u>Bactéries non-pathogènes appartenant aux genres :</u>
Cytomégalo virus	<i>Streptococcus</i>
Lentivirus	<i>Lactococcus</i>
	<i>Lactobacillus</i>

Tableau modifié de (Plotkin, 2009).

En 1923, la découverte et l'inactivation de toxines bactériennes (diphthérique et tétanique) a permis le développement de vaccins dits sous-unitaires par Gaston Ramon. Ainsi, des vaccins totalement nouveaux ont été mis au point à base de toxines inactivées. Ceci a permis un développement majeur de la recherche sur des vaccins constitués de seulement quelques parties des pathogènes (Plotkin, 2005). Dans ce sens des vaccins ont été mis au point avec des protéines recombinantes, un exemple étant le vaccin contre l'hépatite B utilisé en combinaison avec le virus inactivé de l'hépatite A dans le vaccin Twinrix® de GlaxoSmithKline (Plotkin, 2009; Plotkin et Plotkin, 2011). De plus des polysaccharides de capsule bactérienne ont aussi été utilisés en combinaison ou non avec des protéines bactériennes pour faire des vaccins anti-pneumocoques ou méningocoques (Plotkin, 2005). Finalement des particules pseudo-virales, VLP (pour «Virus-Like Particles») servent aussi de vaccins sous-unitaires et sont des capsides virales ne contenant pas le matériel génétique du virion (Roldao et al., 2010).

1.2.1.2 Les vaccins : un risque contrôlé ou un risque acceptable ?

Il est incontestable aujourd'hui que les vaccins avec les antibiotiques ont révolutionné la lutte contre les maladies infectieuses depuis le XIXème siècle. Le plus grand succès de la vaccination est l'éradication de la variole. La poliomyélite, une autre maladie très grave, est presque éradiquée aujourd'hui.

Concernant la poliomyélite, deux vaccins, toujours employés à ce jour, ont permis d'arriver à ce bilan. Il s'agit du vaccin à pathogène atténué d'Albert Sabin et le vaccin inactivé de Jonas Salk (Minor, 2012). Ce dernier a connu des débuts difficiles puisque des vaccinations avec une mauvaise inactivation du virus ont entraîné des centaines de cas de poliomyélites paralysantes ainsi qu'une dizaine de morts en 1955 (Juskewitch et al., 2010). Le vaccin oral d'Albert Sabin pose aussi des questions quant à son utilisation. Après passage dans l'intestin des personnes

vaccinées, le pathogène vivant atténué peut subir des modifications et regagner de la virulence (Minor, 2012). Celui-ci peut alors se retrouver dans l'environnement via son excrétion dans les eaux usées. Dans les années 2000, des souches vaccinales ont causé des épidémies chez des enfants non vaccinés en Chine (Liang et al., 2006), ou en Afrique (Wassilak et al., 2011). Aujourd'hui, l'usage du vaccin inactivé prend plus d'ampleur que le vaccin atténué vivant (Minor, 2012). Cependant ce dernier est toujours recommandé par l'OMS pour permettre l'éradication de la maladie. Notons tout de même que le risque associé à la prise du vaccin reste acceptable par rapport aux bénéfices apportés à la santé de la population humaine.

1.2.2 Vaccins anti-rotavirus commerciaux

Depuis les années 1980 et en raison de l'impact socio-économique du rotavirus, les biologistes et les sociétés pharmaceutiques se sont intéressés à la mise au point d'un vaccin anti-rotavirus. Ils ont suivi l'exemple d'Albert Sabin, qui a conçu le vaccin oral contre la poliomyélite en 1962. Ce dernier s'est basé sur le postulat que les virus vivants atténués imitent mieux la protection acquise pendant une infection naturelle que les virus tués. Par conséquent, les biologistes se sont concentrés sur des souches de rotavirus vivantes atténuées et pouvant être administrées par voie orale (Shaw, 2006). Cette stratégie a connu des débuts difficiles car les essais avec des souches atténuées bovines, humaines et simiennes se sont avérés décevants et contradictoires en terme de protection dans différentes régions du monde. L'éloignement génotypique des souches animales, la trop forte atténuation empêchant la réplication chez l'homme, ainsi que la nature monovalente de ces vaccins ont été à l'origine de leur manque de polyvalence et d'efficacité (Shaw, 2006). Pendant ce temps la structure du rotavirus était mise à nu et l'exploitation de la capacité du rotavirus à réassortir ses gènes a permis la mise sur le marché américain du vaccin Rotashield® par Wyeth Laboratories en 1998. L'agence américaine du médicament (FDA pour «Food and Drug Administration») autorisa l'administration

aux enfants de deux à six mois de ce vaccin composé de quatre souches simiennes vivantes atténuées ayant des gènes réassortis pour exprimer différentes protéines VP7 humaines. En 1999, ce vaccin a été volontairement retiré du marché suite à plusieurs cas d'invagination intestinale (qui ont causé la mort de certains nourrissons) qui ont été reliés au programme de vaccination (Minodier et al., 2007; World-Health-Organization, 2007). Plus précisément, le risque d'invagination a été multiplié par presque trente après la prise du vaccin Rotashield® (World-Health-Organization, 2012). Comme le risque réel associé aux souches vivantes atténuées reste aujourd'hui mal précisé et les mécanismes causant l'invagination hypothétiques (Cunliffe et Nakagomi, 2005; Minodier et al., 2007), deux nouveaux vaccins vivants-atténués, Rotateq® et Rotarix®, sont commercialisés depuis le printemps 2006 (Angel et al., 2007).

Rotateq® (Merck Frosst) est un vaccin pentavalent constitué de cinq souches de rotavirus réassorties à partir de souches bovines et humaines. Rotarix® (GlaxoSmithKline; GSK) est une souche G1P[8] humaine vivante atténuée. Le risque d'invagination n'a pas été mis en évidence lors des études de tolérance pendant les essais cliniques de grande envergure (sur plus de 70 000 enfants). Il est à noter que contrairement au vaccin Rotashield® l'âge minimum des nourrissons pour recevoir la première dose a été réduit et se limite à 6 à 12 semaines. Ces précautions diminueraient le risque d'invagination (Ruiz, 2006; World-Health-Organization, 2007). Une pharmacovigilance attentive a cependant été mise en place dès leur mise sur le marché (Arvin et Greenberg, 2006; Minodier et al., 2007). C'est pourquoi en 2009, l'âge minimum des nourrissons a été étendu de 6 à 15 semaines. Toutefois depuis 2009, des analyses d'innocuité ont révélé un risque d'invagination accru lié à Rotateq® en Australie et à Rotarix® en Australie et au Mexique. Ce risque est multiplié par 4 ou 6 et reste bien inférieur à celui associé à Rotashield® (World-Health-Organization, 2012). Dans d'autres populations, aucune augmentation du

risque d'invagination n'a été reportée (Soares-Weiser et al., 2012; World-Health-Organization, 2012; Zickafoose et al., 2012). En 2012, l'OMS a estimé que les avantages que présente la vaccination anti-rotavirus pour les nourrissons de tous âges l'emportent largement sur les risques, en particulier dans les pays en développement qui ont une mortalité liée aux infections à rotavirus modérée à élevée (World-Health-Organization, 2012).

1.2.3 Autres voies de recherche

Dans l'optique de mettre au point des vaccins plus sécuritaires que les virus vivants atténués, les biologistes se sont tournés vers l'inactivation du rotavirus mais ces travaux sont restés en stade préclinique (Jiang et al., 2008). Le rotavirus inactivé est utilisé en injection intramusculaire et peu d'études démontrent une protection totale contre des infections expérimentales (Jiang et al., 2008). Plusieurs études ont été réalisées chez la souris (Jiang et al., 2008), notamment une où une protection complète a été observée contre le rotavirus simien (RRV). Dans cette étude, les animaux avaient reçu des injections intramusculaires de cette souche de rotavirus inactivée en mélange avec un adjuvant lipidique (Johansen et al., 2003). Chez les porcelet une protection a été observée avec l'utilisation d'une souche humaine G1P[8] inactivée en combinaison avec des sels d'aluminium comme adjuvant (Wang et al., 2010).

Les biologistes se sont aussi tournés vers l'expression d'éléments antigéniques purifiés et non réplicatifs pour des vaccins sous-unitaires de nouvelle génération. Élaborer de tels vaccins représente un véritable défi car les antigènes recombinants sont habituellement moins immunogéniques que le pathogène entier et nécessitent une administration avec des immunomodulateurs puissants (Plotkin, 2009; Reed et al., 2009; Ryan et al., 2001) ou bien requièrent l'usage de vecteurs (Robert-Guroff, 2007) pour induire une immunité protectrice.

1.2.3.1 Les vaccins sous-unitaires contre le rotavirus : les antigènes utilisés

Pour élaborer des vaccins sous-unitaires contre le rotavirus, les protéines VP7, VP8*, VP6, VP4, VP2 et NSP4 ont été retenues comme protéines candidates (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003; Choi et al., 2005a; Choi et al., 2005b; Choi et al., 2006a; Kovacs-Nolan et Mine, 2006). Les protéines VP7 et VP4 ont été choisies car ce sont les seules protéines situées à la surface du virion. Lors d'une infection naturelle elles induisent la production d'anticorps neutralisants. Le blocage de l'attachement du virus à la surface des cellules cibles et l'inhibition ultérieure des interactions entre le virus et la surface de la cellule après que les virions se soient attachés aux récepteurs de surface sont les deux mécanismes clé ciblés par la neutralisation du virus (Fleming et al., 2007). Le changement de conformation de VP4 dû au pH élevé de la lumière du jéjunum et le clivage par la trypsine pancréatique de cette protéine en VP8* et VP5* représentent la première étape dans l'attachement du virus aux cellules (Pesavento et al., 2005). Pour la souche humaine Wa, il a été montré que VP8* possède trois épitopes neutralisants (Kovacs-Nolan et al., 2003). Il est donc possible que ces anticorps neutralisants inhibent les changements de conformation donnant l'accès aux motifs de liaison sur les domaines VP5*. Les anticorps neutralisants contre VP5* empêchent directement la liaison à la cellule (Dormitzer et al., 2004; Graham et al., 2006). Finalement, les anticorps neutralisants contre les épitopes de VP7 n'empêchent ni la liaison à la cellule ni l'entrée mais bloquent principalement le processus de décapsidation nécessaire à la réplication du virus (Ludert et al., 2002). VP7 possède trois épitopes conformationnels contre lesquels les anticorps neutralisants sont dirigés (Huang et al., 2000). Même si la réponse à médiation cellulaire est moins étudiée dans les évaluations de vaccins (Franco et al., 2006; Plotkin, 2010), la protéine VP7 est connue pour induire une réponse cellulaire en activant les lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Buesa et al., 1999; Heath et al., 1997; Jaimes et al., 2005). De plus, il a été

montré que VP7 dans les particules virales matures pouvait activer de manière polyclonale les lymphocytes B *in vitro* (Blutt et al., 2004).

Le protéine VP6 est la protéine la plus abondante dans la particule virale (Pesavento et al., 2006) et aussi la plus immunogénique en terme de réponse en anticorps lors d'infection naturelle (Chang et al., 2001). Elle est aussi la cible d'une réponse cellulaire (Jaimes et al., 2005). Cependant elle ne permet pas la synthèse d'anticorps neutralisants qui empêchent l'entrée du virus dans les cellules, car elle constitue la deuxième capsid et n'est pas exposée à la surface du virion (Pesavento et al., 2006). Toutefois, son utilisation a démontré une protection lors d'infection de défi dans des modèles murins (Franco et al., 2006). Un mécanisme d'action possible mais seulement démontré chez la souris serait la neutralisation du virus à l'intérieur même des entérocytes par des sIgA anti-VP6 qui sont transcytés pour être excrétés dans la lumière intestinale (Corthesy et al., 2006; Franco et al., 2006). La protéine VP2, constituant la première capsid, est quant à elle, le plus souvent utilisée en combinaison avec VP6 dans des VLP. Elle ne génère pas de réponse en anticorps neutralisants (Franco et al., 2006). La protéine NSP4 a aussi été utilisée. Sa liaison avec des anticorps spécifiques empêche son action d'entérotoxine et par là les diarrhées mais n'empêche pas l'infection des cellules et la sécrétion de nouveaux virus (Franco et al., 2006).

1.2.3.1.1 Les protéines recombinantes purifiées employées directement sans vecteur pour les administrer

Certains des antigènes du rotavirus listés dans la section précédente ont été utilisés comme protéines recombinantes purifiées. Les systèmes d'expression employés sont des systèmes procaryote ou eucaryote avec les levures et le système «baculovirus/cellules d'insecte». VP4 a été produite avec ce dernier et a montré une immunogénicité chez le lapin (Khodabandehloo et al., 2009). Les levures ont servi

pour obtenir VP8* (Andres et al., 2006). *Escherichia coli* a permis de produire les protéines recombinantes suivantes : VP7 (Choi et al., 2005b; Yuan et al., 2001b), VP6 (Choi et al., 2004; Choi et al., 2002; McNeal et al., 2007; McNeal et al., 2006) et NSP4 (Choi et al., 2005a; Choi et al., 2006b). Une construction d'un épitope neutralisant de VP8* mis en tandem trois fois a montré une meilleure immunogénicité que VP8* en entier (Kovacs-Nolan et Mine, 2006). Des peptides issus de VP4 ont aussi été utilisés comme immunogènes (Ijaz et al., 1998). Les études d'immunogénicité de ces protéines recombinantes ont été réalisées chez la souris. Les études montrant une protection ont utilisé VP6, NSP4 ou un peptide de VP4 comme antigènes (Choi et al., 2004; Choi et al., 2002; Choi et al., 2005a; Ijaz et al., 1998; McNeal et al., 2007; McNeal et al., 2006). Toutefois il faut souligner que, dans ces études, l'emploi d'adjuvant a été nécessaire pour obtenir une protection avec des modèles murins d'infection.

1.2.3.1.2 Les particules pseudo-virales dites VLP

Les VP du rotavirus ont de remarquables capacités d'auto-assemblage. La synthèse simultanée de VP2, VP6, VP7 par des cellules en culture aboutit à la formation de VLP qui ont la même architecture que le virus mais qui sont dépourvues de matériel génétique. Ces VLP sont obtenues avec des systèmes d'expression de protéines «baculovirus/cellules d'insecte» (Roldao et al., 2012). Récemment une équipe a obtenu des VLP avec un système d'expression chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Rodriguez-Limas et al., 2011). Une autre équipe a synthétisé des VLP grâce à un système d'expression transitoire dans le tabac (Yang et al., 2011). Ces techniques, moins coûteuses que le système «baculovirus/cellules d'insecte», permettront peut-être un développement plus poussé des vaccins anti-rotavirus à base de VLP. Celles-ci sont une alternative aux vaccins vivants atténués et plusieurs vaccins à base de VLP sont actuellement sur le marché comme par exemple

Engerix® (contre le virus de l'hépatite B) et Cervarix® (contre le papillomavirus) de GlaxoSmithKline (Roldao et al., 2010).

Cette approche a été largement exploitée contre le rotavirus mais reste encore aujourd'hui au stade préclinique (Coste et al., 2000; Iosef et al., 2002; Nguyen et al., 2003; Parez et al., 2006; Yuan et al., 2001a). Plusieurs sortes de VLP constituées de différentes VP ont été développées. Des équipes ont construit des VLP constituées de VP2/4/6/7 et de VP2/6/7 (Conner et al., 1996; Coste et al., 2000). Des VLP constituées seulement de VP2/6 ont aussi été construites et testées chez les animaux (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003; Coste et al., 2000; Yuan et al., 2000; Zhou et al., 2011). Une construction où VP2 et VP8* ont été fusionnées a aussi permis de construire des VLP (VP8-2/6/7) (Istrate et al., 2008; Parez et al., 2006). Cependant, inoculées seules par voie orale, ces VLP induisent seulement des IgG et non des sIgA et échouent pour protéger contre l'infection (Franco et al., 2006). Co-administrées avec le virus atténué vivant, elles permettent de protéger les porcelets de l'infection par la souche humaine Wa (Nguyen et al., 2003; Yuan et al., 2001a). Finalement, une protection a été obtenue chez la souris par des VLP administrées par voie rectale (Agnello et al., 2006; Parez et al., 2006) ou intranasale (Coste et al., 2000) mais en co-inoculation avec des adjuvants tels que la toxine du choléra (CT), la toxine thermolabile d'*Escherichia coli* modifiée ou bien des CpG.

1.2.3.2 Les vaccins sous-unitaires contre le rotavirus : les vecteurs étudiés

1.2.3.2.1 Les vecteurs plasmidiques

L'utilisation d'ADN nu plasmidique pour des vaccinations est grandissante et a permis de générer une immunité protectrice dans différentes études depuis ces dix dernières années (Gurunathan et al., 2000; Herrmann, 2006; Sasaki et al., 2003). Pourtant dans le cas du rotavirus, de tels vaccins ADN délivrés par voie systémique

(par «gene gun») n'ont pas induit d'immunité protectrice chez la souris (Choi et al., 1998; Choi et al., 1997). Administrés par voie intranasale, des plasmides exprimant VP6 ont généré des sIgA au niveau de la muqueuse intestinale sans toutefois être protecteurs (Garcia-Diaz et al., 2004).

1.2.3.2.2 Les vecteurs viraux

Par le désamorçage de leur pouvoir pathogène grâce au génie génétique, certains virus sont convertis en vecteurs ADN. Ils représentent une très grande amélioration des vecteurs plasmidiques pour délivrer le gène d'intérêt et pour augmenter son expression et par là faciliter sa présentation au système immunitaire (Souza et al., 2005). Pour des vaccins anti-rotavirus, ces vecteurs ont été peu utilisés. Les poxvirus ont d'abord été étudiés pour délivrer des gènes rotaviraux et générer des anticorps dans les années 1990, mais aucune étude n'a été répertoriée depuis (Poncet et al., 1990). Les vecteurs adénovirus (Ad) non réplicatifs et non disséminatifs ont aussi été utilisés pour produire les protéines VP4, VP6 et VP7 (Li et al., 2004; Liu et al., 2005; Wang et al., 2008; Wei et al., 2004; Zhou et al., 2011). L'optimisation de l'usage des codons a été employée comme stratégie pour augmenter l'expression des gènes rotaviraux dans les cellules de mammifères (Wang et al., 2008).

Des études d'immunogénicité ont été réalisées chez des souris avec des Ad exprimant les protéines VP4 (Liu et al., 2005), VP7 et VP6 (He et al., 2002; Li et al., 2004). La protection contre une infection dans un modèle murin d'immunité passive a été seulement étudiée avec VP4 et les meilleurs résultats ont été observés avec l'utilisation de la voie intra-nasale comparativement à la voie orale et la voie intramusculaire utilisée pour vacciner des souris gestantes (Liu et al., 2005). Des Ad recombinants pour immuniser contre VP7 et VP6 ont été évalués pour leur sécurité chez les jeunes singes (Li et al., 2004). Récemment, des Ad codant la protéine VP6

ont été utilisés en combinaison avec des VLP (constituées des VP2 et VP6) chez la souris (Zhou et al., 2011).

1.2.3.2.3 Les vecteurs bactériens

Les vecteurs bactériens vivants présentent l'intérêt de pouvoir être administrés par voie orale. Ils ont à leur surface ou dans leur cytoplasme les antigènes du rotavirus servant à vacciner. Des bactéries non pathogènes ou des pathogènes modifiés ont été utilisés comme vecteur dans des vaccins contre le rotavirus. Toutes les études ont été réalisées chez la souris et sont répertoriées dans le tableau 1.5. Ces études ont principalement montré l'immunogénicité des antigènes du rotavirus administrés grâce aux vecteurs bactériens et peu d'entre elles montrent des modèles d'expérience de défi avec une protection partielle (Lee et al., 2010; Marelli et al., 2011) ou nulle (Coste et al., 2001).

Tableau 1.5 : Études chez la souris de vecteurs bactériens pour des vaccins anti-rotavirus

Vecteurs bactériens	Protéines du rotavirus de souche humaines ou animales	Résultats	Références
<u>Bactéries non pathogènes</u>			
<i>Lactococcus lactis</i>	VP8*	Immunogénicité Immunogénicité et protection partielle	(Marelli et al., 2011) (Rodriguez-Diaz et al., 2011)
	VP4	Immunogénicité	(Li et al., 2010)
<i>Lactococcus casei</i>	VP4	Immunogénicité	(Qiao et al., 2009)
<i>Lactobacillus lactis</i>	VP7	Immunogénicité	(Perez et al., 2005)
<i>Bacillus subtilis</i>	VP6	Immunogénicité et protection partielle	(Lee et al., 2010)
<i>Escherichia coli</i>	VP7	Immunogénicité	(Wang et al., 1999)
<u>Bactéries pathogènes modifiées</u>			
<i>Salmonella typhimurium</i>	VP7	Immunogénicité	(Wang et al., 1999)
	VP6 et VP2	Immunogénicité et pas de protection	(Coste et al., 2001)
<i>Shigella flexneri</i>	VP4	Immunogénicité	(Loy et al., 1999)

1.2.3.2.4 Les plantes transgéniques

Depuis plusieurs décennies, la production de protéines recombinantes par des plantes transgéniques est une stratégie qui suscite beaucoup d'espoir dans la recherche sur les vaccins. Une absence de contamination possible par des pathogènes humains et de faibles coûts de production à grande échelle en sont les principaux avantages (Daniell et al., 2009; Dus Santos et Wigdorovitz, 2005; Granell et al., 2010;

Streatfield et Howard, 2003; Vezina et al., 2009). De plus, les vaccins à base de plantes comestibles ne requièrent pas d'étapes de purification, sont plus faciles à stocker en évitant la chaîne du froid et très facile à administrer par la voie orale (Daniell et al., 2009; Sala et al., 2003). Les vaccins à base de plantes transgéniques sont obtenus par deux systèmes d'expression de protéines recombinantes, soit un système d'expression transitoire, ou soit un système d'expression stable (Daniell et al., 2009; Vezina et al., 2009). Les avantages du transitoire par rapport au stable sont la rapidité et les faibles coûts de production. Cette première approche est appropriée pour faire des preuves de concept avant de générer des lignées de plantes transgéniques qui expriment les protéines recombinantes de manière stable et qui nécessitent de longs mois de mise au point (Daniell et al., 2009).

Malgré ces avantages aucun vaccin à base de plantes n'est aujourd'hui commercialisé (Daniell et al., 2009). Les principales difficultés auxquelles se sont heurtées les chercheurs sont d'une part une faible immunogénicité des protéines recombinantes produites chez la plante comparativement à un vaccin à base de pathogènes vivants-atténués et d'autre part l'utilisation de la voie orale pour les administrer (Mishra et al., 2010; Silin et al., 2007). En effet cette voie est certes pratique mais présente deux obstacles à l'efficacité des vaccins qui sont la dégradation des antigènes par les enzymes digestives (Lugade et al., 2010; Plotkin, 2009; Silin et al., 2007) et la tolérance immunitaire induite contre les antigènes dans l'intestin (Mason et al., 2008; Simon et Kotloff, 2010). Cependant, il faut souligner que la recherche dans ce domaine reste très active et les plantes sont aussi étudiées pour être des systèmes d'expression de protéines recombinantes à grande échelle pour faire des vaccins (Daniell et al., 2009). Dans cette optique, un vaccin contre la grippe H5N1 produit dans des plantes est actuellement en phase III d'étude clinique (Landry et al., 2010).

Dans le cas du rotavirus, plusieurs systèmes de plantes transgéniques ont été produits et testés chez les animaux. Le succès des systèmes d'expression à base de plantes a permis de stimuler une réponse immunitaire spécifique au rotavirus (Li et al., 2006; Saldana et al., 2006; Yang et al., 2011; Yu et Langridge, 2003) et une protection dans des modèles murins d'infection (Dong et al., 2005; Perez Filgueira et al., 2004; Wigdorovitz et al., 2004; Zhou et al., 2010b). Le tableau 1.6 répertorie plusieurs exemples de vaccins à base de plantes en fonction des protéines du rotavirus choisies, du système d'expression transitoire ou stable. À titre d'exemple, Saldana et ses collaborateurs ont exprimé des VLP constituées de VP2 et VP6 dans des tomates transgéniques (Saldana et al., 2006) et Li et collaborateurs ont exprimé de manière stable la protéine VP7 de la souche Wa dans la pomme de terre (Li et al., 2006).

Tableau 1.6 : Vaccins contre le rotavirus à base de plantes transgéniques

Protéines du rotavirus choisies pour le vaccin	Plante / Système d'expression	Modèle animal testé / Immunogénicité (I) ou Protection (P)	Références
VP6	Tabac / transitoire	Non applicable	(Inka Borchers et al., 2012)
	<i>Chenopodium amaranticolor</i> / stable	Souris / P partielle	(Zhou et al., 2010a)
	Alfalfa / stable	Souris / P partielle	(Dong et al., 2005)
	Pomme de terre / stable	Souris / I	(Yu et Langridge, 2003)
VP8*	Tabac / transitoire	Souris / P	(Lentz et al., 2011)
	Tabac / transitoire	Souris / P partielle	(Perez Filgueira et al., 2004)
VLP (VP2/VP6/VP7)	Tabac / transitoire	Souris / I	(Yang et al., 2011)
VLP (VP2/VP6)	Tomate / stable	Souris / I	(Saldana et al., 2006)
VP7, VP4Δ(1-336)	Tabac / transitoire	Souris / I	(Bergeron-Sandoval et al., 2011)
VP7	Pomme de terre / stable	Souris / I	(Li et al., 2006)
	Pomme de terre / stable	Non applicable	(Choi et al., 2006c)
	Pomme de terre / stable	Non applicable	(Choi et al., 2005b)
Peptide de VP4	Alfalfa / stable	Souris / P partielle	(Wigdorovitz et al., 2004)

1.2.3.3 Les vaccins sous-unitaires contre le rotavirus : les adjuvants étudiés

Mêmes s'ils sont immunogènes intrinsèquement, les pathogènes inactivés et les protéines recombinantes administrées dans les vaccins sous-unitaires sont souvent co-administrés avec des adjuvants. En effet, ils induisent une réponse immunitaire moins efficace que les pathogènes atténués vivants (Mishra et al., 2010; Silin et al., 2007). Les adjuvants sont définis comme des composés qui peuvent soit augmenter, soit moduler ou soit accélérer la réponse immunitaire induite par un immunogène (Reed et al., 2009). Ils permettent de mieux administrer les antigènes en améliorant

leur présentation au système immunitaire. Des sels minéraux, émulsions, liposomes et virosomes en sont quelques exemples (Reed et al., 2009; Sun et al., 2009). Parmi cette catégorie, quelques-uns, comme l'Alum (gel d'hydroxide d'aluminium) et le Squalène MF-59TM (émulsions huile dans l'eau) sont très utilisés dans des vaccins administrés par injections systémiques chez l'homme (Gosselin et al., 2009; Plotkin, 2009; Reed et al., 2009; Silin et al., 2007). Les adjuvants peuvent aussi être des immunomodulateurs tels que des agonistes des TLR, des cytokines et des toxines bactériennes (Ahmed et al., 2011; Reed et al., 2009; Silin et al., 2007). À titre d'exemple, l'Alum s'avère être un activateur de l'inflammasome dans les cellules dendritiques (Kool et al., 2008). Il est à noter que certains adjuvants comme l'adjuvant complet de Freund ou la toxine du choléra (CT) ne peuvent être employés chez l'homme car trop toxiques (Reed et al., 2009).

Comme mentionné dans les sections concernant les vaccins sous-unitaires anti-rotavirus, plusieurs adjuvants ont été employés dans de nombreuses études. Le tableau 1.7 est une liste exhaustive des adjuvants utilisés avec des antigènes du rotavirus par différentes voies d'administration. Le terme immunogénicité (I) est employé dans ce tableau lorsque l'immunogénicité des protéines du rotavirus a été étudiée dans un modèle animal sans faire une étude de protection contre une infection. Il est aussi mentionné si une protection (P) contre une infection a été étudiée dans un modèle animal. Pour résumer, les adjuvants ont surtout été employés en mélange avec des VLP ou les protéines recombinantes VP6. Très peu d'études montrent l'emploi d'adjuvants protéiques en fusion avec des protéines du rotavirus (Choi et al., 2005b; Choi et al., 2006a; Choi et al., 2006b).

Tableau 1.7 : Adjuvants employés dans des vaccins sous-unitaires anti-rotavirus

Adjuvants	Mélange (M) ou protéine de fusion (F)	Protéines du rotavirus	Voie d'administration	Modèle animal / Immunogénicité (I) ou protection (P)	Références
Hydroxide d'aluminium (Alum)	M	VLP	Systémique	Souris / P	(Jiang et al., 1999)
ISCOM	M	VLP	Orale	Porcs gnotobiotiques / pas de P	(Nguyen et al., 2003)
Saponine	M	VLP	Systémique	Lapins / P	(Ciarlet et al., 1998)
	M	VLP	Systémique	Souris / P partielle	(Jiang et al., 1999)
	M	VLP	Systémique	Souris / I	(Madore et al., 1999)
Toxine thermolabile d' <i>E. coli</i> modifiée	M	VLP	Intra-nasale	Porcs gnotobiotiques / pas de P	(Yuan et al., 2000)
	M	VLP	Intra-nasale	Souris / P	(Bertolotti-Ciarlet et al., 2003)
	M	VLP	Rectale	Souris / P partielle	(Parez et al., 2006)
	M	VP6	Rectale	Souris / P partielle	(McNeal et al., 2007)
	M	VP6	Intra-nasale	Souris / P partielle	(McNeal et al., 2006)
	M	VP6	Orale / intra-nasale	Souris / P partielle	(Choi et al., 2002)
Toxine du choléra (CT)	M	VLP	orale	Souris / P	(Bertolotti-Ciarlet et al., 2003)
	M	VLP	Intra-nasale	Souris / P	(Coste et al., 2000)
	M	VLP	Rectale	Souris / P	(Parez et al., 2006)
	M	VLP	Orale	Souris / I	(Yang et al., 2011)
	M	VP6	Rectale	Souris / P partielle	(McNeal et al., 2007)
CTB	F	VP7	Non applicable	Non déterminé	(Choi et al., 2005b)
RTB (Toxine B de la ricine)	F	NSP4	Systémique	Souris / I	(Choi et al., 2006b)
	F	NSP4	Orale	Souris / I	(Choi et al., 2006a)

CpG	M	VLP	Rectale	Souris / pas de P	(Parez et al., 2006)
	M	VP6	Intra-nasale et orale	Souris / P partielle	(Choi et al., 2002)
	M	VP6	Orale	Souris / P partielle	(Dong et al., 2005)

1.3 Les adénovirus recombinants comme vecteurs vaccinaux

1.3.1 Classification des adénovirus

Les Ad appartiennent à la famille des *Adenoviridae* qui se divisent en plusieurs genres incluant celui des *Mastadenovirus* qui regroupe les adénovirus infectant les mammifères incluant les humains, simiens, bovins, canins et porcins. Depuis leur découverte en 1953, plus de 50 sérotypes infectant l'humain ont été répertoriés (Lasaro et Ertl, 2009; Tatsis et Ertl, 2004). Ces sérotypes sont classés en 7 sous-groupes (A à G) en fonction des homologies de séquences de leurs génomes (Robinson et al., 2011; Walsh et al., 2011). Les Ad de sérotypes 2 et 5 appartenant au sous-groupe C sont les plus étudiés (Lasaro et Ertl, 2009; Souza et al., 2005; Tatsis et Ertl, 2004). Les Ad causent le plus souvent des maladies respiratoires comme le rhume ou des conjonctivites et parfois des gastro-entérites en infectant généralement les épithéliums oculaires, respiratoire ou gastro-intestinal. Cependant certains sérotypes (12, 18 ou 31) peuvent aussi induire des tumeurs chez les rongeurs (Souza et al., 2005; Tatsis et Ertl, 2004).

1.3.2 Morphologie des adénovirus

Les virions, d'un diamètre de 60 à 90 nm, sont non enveloppés et leur capsid est de symétrie icosaédrique. Trois protéines structurales, l'hexon, le penton et la fibre, composent la capsid. Les hexons et les pentons forment des capsomères. Les capsomères situés aux douze sommets de l'icosaèdre se prolongent avec la fibre (Russell, 2009; Stewart et al., 1993). Une photographie en microscopie électronique et un schéma des virions est présentée dans la figure 1.5. Des protéines dites mineures, les polypeptides IIIa, VI, VIII et IX sont aussi associées à la capsid et sont représentées dans la figure 1.6 ci-après.

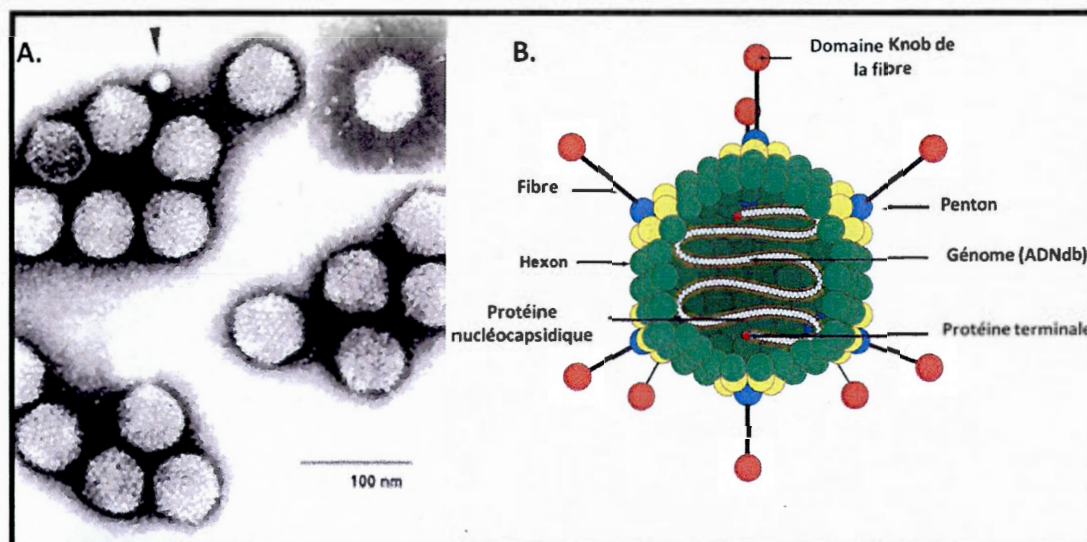


Figure 1.5 : Structure des adénovirus.

A : Observation de la structure des Ad en microscopie électronique à transmission. B: Schéma de la structure du virion avec son génome et les différentes protéines structurales. Figure modifiée à partir de:

http://www.daviddarling.info/encyclopedia/A/adenovirus_infection.html, (consultée le 24 avril 2012).

Le génome des Ad est composé par un seul segment linéaire d'ADN double brin d'une taille variant de 30 à 40 kb. Chaque extrémité du génome est terminée par des séquences répétées inversées appelées ITR (pour «Inverted Terminal Repeats»), qui servent d'origine de réplication et qui sont chacune liées à une protéine terminale (Russell, 2009). Des protéines dites nucléocapsidiques sont associées à l'ADN viral et sont représentées dans la figure 1.6 comme les «core proteins».

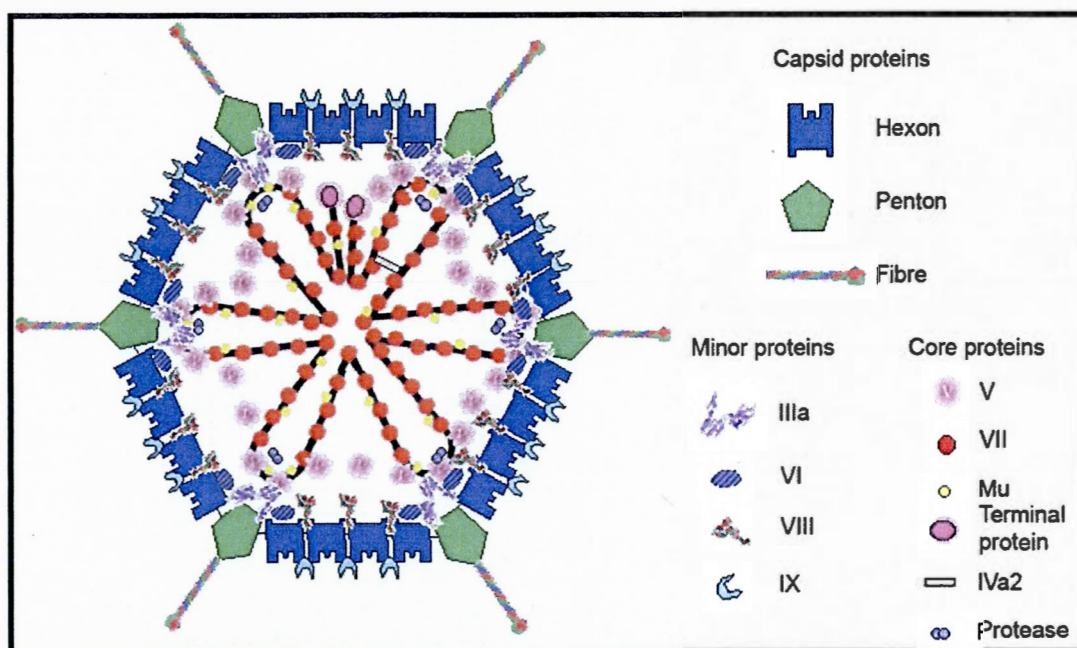


Figure 1.6 : Structure des adénovirus avec les protéines mineures et nucléocapsidiques.

Schéma de la structure du virion avec son génome et les différentes protéines structurales. Figure modifiée de (Russell, 2009).

1.3.3 Cycle de réplication

La transmission des Ad se fait principalement par aérosols. Le virus entre alors en contact avec un épithélium au niveau des muqueuses de l'hôte où il peut se lier à plusieurs protéines cellulaires. Mis à part ceux du sous-groupe B, les Ad se lient par leur domaine Knob de la fibre (représenté dans la figure 1.5) au récepteur CAR (pour «Coxsackie and Adenovirus Receptor») appartenant à la superfamille des immunoglobulines et impliqué dans la formation des jonctions serrées (Arnberg, 2009). La fibre des Ad du sous-groupe C peut aussi se lier au CMH I et à VCAM-1 (pour «Vascular Adhesion Molecule 1»). Le penton de la majorité des Ad humains possède un motif RGD reconnu par des intégrines. Cette liaison n'est pas nécessaire pour initier l'attachement du virion à la cellule mais contribue à l'entrée par endocytose des virions (Arnberg, 2009). Dans les endosomes, la capsid des Ad se

désassemble et perd les pentons et fibres, permettant la rupture de la membrane endosomale. Le désassemblage se poursuit dans le cytoplasme, ne laissant que les hexons pour envelopper le génome et les protéines nucléocapsidiques. Le virion migre alors vers le noyau via les microtubules. Seul le génome et les protéines nucléocapsidiques entrent dans le noyau via les pores nucléaires. La transcription du génome commence dans le noyau sans insertion dans le génome de la cellule hôte. La réplication du génome et l'assemblage des virions a lieu dans le noyau des cellules infectées (Russell, 2009).

Les deux brins d'ADN servent de matrice pour la synthèse des protéines virales. Deux types de domaines sont distingués en fonction de la phase du cycle de réplication dans laquelle ils sont transcrits. Ces phases sont qualifiées de précoce ou tardive. Les protéines traduites pendant la phase précoce sont issues des domaines E1 à E4, tandis que les domaines L1 à L5 sont transcrits et traduits pendant la phase tardive. Les chiffres indiquent l'ordre chronologique dans lequel sont transcrits les domaines (Alba et al., 2005; Russell, 2009). Ces domaines sont schématisés dans la figure 1.7.

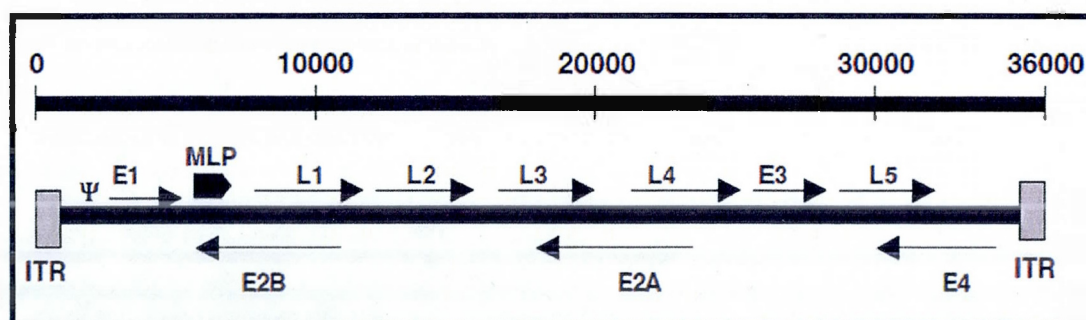


Figure 1.7 : Organisation du génome des Ad5.

La transcription du génome des adénovirus se fait à partir des deux brins d'ADN et a lieu en deux phases, dites précoce (E pour «early») ou tardive (L pour «late»). Les régions transcrites pendant la phase précoce ou tardive sont indiquées par des flèches. Le signal d'encapsidation (Ψ) est situé après l'ITR de gauche, ainsi que le promoteur majeur de la phase tardive (MLP pour «major late promoter»). Figure tirée de (Alba et al., 2005).

Les protéines produites à partir de la région E1A permettent la réplication du génome viral et sont nécessaires à la régulation de la transcription du génome viral. Les protéines issues de la région E1B bloquent le transport des ARNm de la cellule hôte (Tatsis et Ertl, 2004). La région E2 code notamment pour l'ADN polymérase et la protéine terminale. La région E4 est aussi impliquée dans la multiplication des virus. Par contre, la région E3 n'est pas nécessaire à la réplication virale mais elle code des protéines qui permettent aux cellules infectées d'échapper au système immunitaire (Krajcsi et al., 1996; Sparer et al., 1996). Elle agit soit en retenant le CMH I au réticulum endoplasmique (Fu et al., 2011) soit en inhibant la production de cytokines inflammatoires (Lesokhin et al., 2002). Les domaines transcrits et traduits pendant la phase tardive serviront à produire les protéines structurales. L'assemblage des nouveaux virions se fait grâce à la protéase (Russell, 2009; Tatsis et Ertl, 2004). Le cycle lytique des Ad humains de sérotype 5 (Ad5) est d'environ 32 à 36 heures et résultent en la production d'environ 10 000 virions par cellule infectée (Tatsis et Ertl, 2004).

1.3.4 Utilisation des adénovirus dans des applications biomédicales

Les Ad ont tout d'abord été utilisés en vaccination pendant plusieurs décennies par l'armée des États-Unis pour limiter l'impact des maladies respiratoires dans ses rangs. Des Ad atténués vivants de sérotypes 4 et 7 ont été employés pour vacciner des millions de soldats américains (Souza et al., 2005). Ainsi, la sécurité quant aux effets secondaires dus aux Ad est bien documentée (Tatsis et Ertl, 2004). Les faits que l'ADN des Ad ne s'intègre pas au génome de la cellule hôte et que les virions peuvent être produits à de hauts titres en ont fait des virus attrayants pour produire des vecteurs viraux ayant des applications aussi bien en thérapie génique qu'en vaccinologie (Rollier et al., 2011; Souza et al., 2005; Tatsis et Ertl, 2004). Les plus employés sont les Ad5 (Souza et al., 2005; Tatsis et Ertl, 2004).

Tableau 1.8 : Usage des vecteurs viraux dans des vaccins testés en études cliniques enregistrées au <http://clinicaltrials.gov> (consulté le 24 avril 2012).

Maladie	Nombre de vaccins testés en études cliniques	Vaccins à base de vecteurs viraux					
		Nombre total	Adénovirus	Poxvirus	VSV	AAV	Alphavirus
Rotavirose	116	0	0	0	0	0	0
Malaria	140	15	11	4	0	0	0
Tuberculose	86	5	4	1	0	0	0
Syndrome d'immunodéficience humaine (SIDA)	586	82	47	29	2	2	2
Cancer	1210	144	116	26	0	0	2

Avec les poxvirus, les Ad sont les vecteurs vaccinaux les plus utilisés en vaccinologie comme le démontre le nombre d'études cliniques sur des vaccins en cours répertoriées dans le tableau 1.8. Ces vecteurs viraux sont employés dans des vaccins notamment pour lutter contre des pathogènes majeurs comme le VIH, *Plasmodium* et *Mycobacterium*. Aucune étude clinique pour des vaccins anti-rotavirus à base de vecteurs viraux n'est en cours.

Pour les vaccinologues, les Ad comme les autres vecteurs viraux présentent l'avantage de reproduire une infection virale et de produire aussi bien une réponse immunitaire en anticorps qu'une réponse à médiation cellulaire (Nakagawa et al., 2001; Souza et al., 2005). Pour sécuriser l'emploi des Ad, une délétion de la région E1 du génome a permis de générer les vecteurs Ad recombinants (AdV) de première génération. Cette délétion permet d'éviter la dissémination des virus dans l'organisme et dans l'environnement en empêchant la réplication virale (Tatsis et Ertl, 2004). C'est aussi dans la région E1 qu'ont été insérés les gènes d'intérêt (transgène) et leur cassette d'expression. La région E3, non nécessaire à la réplication, a aussi été déléetée

dans les AdV de première génération. Plusieurs autres exemples de délétions pour améliorer l'usage de ces vecteurs sont répertoriées dans la figure 1.8 (Souza et al., 2005; Tatsis et Ertl, 2004).

Les dernières améliorations des AdV ont conduit aux AdV dits «gutless» où seul le transgène est encapsidé dans les virions. Pour compenser les délétions et produire des virions recombinants, des lignées cellulaires complémentaires particulières ont été produites. Pour les AdV «gutless», des AdV dit «helper» doivent aussi être utilisés (Alba et al., 2005). Les AdV «gutless» ont été développés pour des applications en thérapie génique où la stimulation du système immunitaire par les protéines du vecteur n'est pas souhaitée.

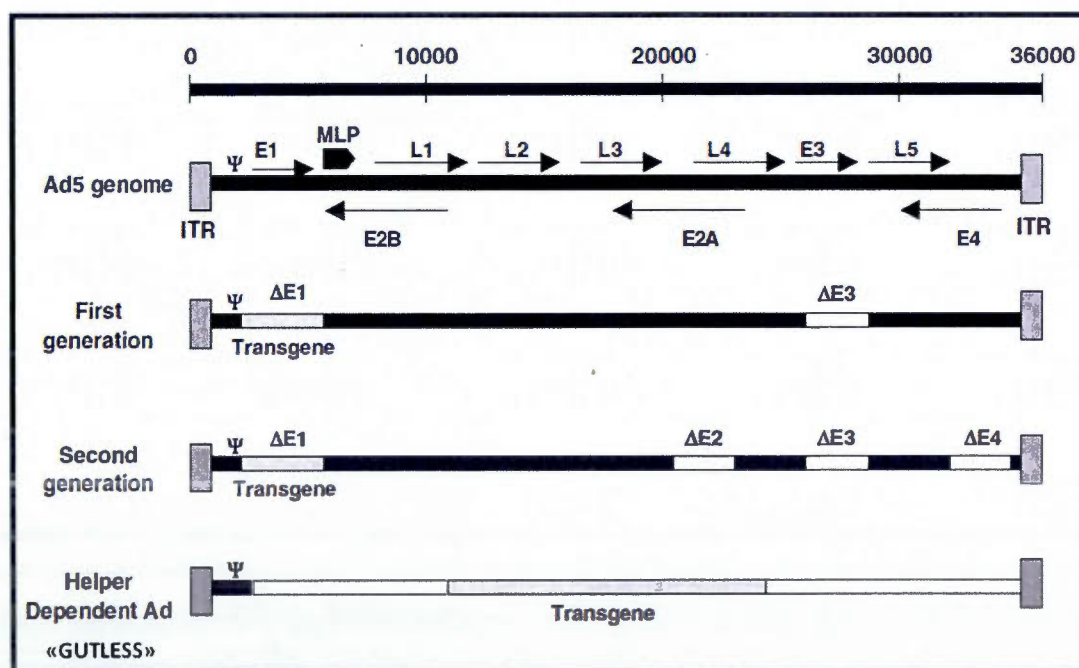


Figure 1.8 : Modification du génome des Ad5 dans le but de faire des vecteurs viraux.

Les différents domaines du génome des Ad5 sont d'abord représentés. Les délétions présentes dans les AdV de différentes générations apparaissent en blanc. Les séquences insérées (transgène) apparaissent en gris. Figure tirée de (Alba et al., 2005).

Les AdV présentent d'autres avantages car ils sont relativement stables et faciles à amplifier et à purifier en haut titre viral après avoir été construits (Souza et al., 2005). Ils peuvent aussi être lyophilisés (Chen et al., 2012a), ce qui est un avantage pour leur utilisation dans des zones géographiques où le maintien de la chaîne du froid est difficile, notamment dans les pays en voie de développement. Comparativement aux poxvirus et aux autres virus recombinants, les AdV sont les vecteurs permettant d'insérer les plus longs transgènes (Alba et al., 2005; Tatsis et Ertl, 2004). Les AdV peuvent aussi être administrés par différentes voies soit systémique ou mucosales (intranasale, orale, vaginale ou rectale) (Lanza et al., 2010; Souza et al., 2005). En général, la co-administration des AdV avec un adjuvant n'est pas nécessaire (Souza et al., 2005; Tatsis et Ertl, 2004).

1.3.5 Utilisation des AdV et réponses immunitaires induites

1.3.5.1 Immunité générée contre le vecteur

Bien que très intéressant comme vecteur vaccinal, les AdV engendrent aussi une réponse immunitaire contre les protéines de l'Ad. Ces dernières sont d'une part exposées à la surface du virion servant de vecteur et d'autre part, exprimées en plus du transgène à partir du génome de l'AdV dans les cellules infectées (Russell, 2009).

1.3.5.1.1 Immunité innée

La capside en elle-même a la capacité d'induire et de moduler l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse inflammatoire notamment avec l'induction des MAP kinases (pour «Mitogen-Activated Protein») et la voie Jak/Stat (Russell, 2009; Stilwell et Samulski, 2004). Certains ont montré que la fibre de l'Ad pouvait être une des composantes de la capside à l'origine de ce mécanisme (Tamanini et al., 2006). Pendant l'infection, l'ADNdb viral est un PAMP reconnu par deux récepteurs de l'immunité innée : le TLR9 situé dans les endosomes et un récepteur à ADN dans

le cytosol. Ces deux PRRs différents conduisent à la production des interférons de type I (Nociari et al., 2007; Randall et Goodbourn, 2008; Russell, 2009).

1.3.5.1.2 Immunité adaptative

L'hexon, le composant majeur de la capside, est une cible majeure de l'immunité adaptative mise en place pendant une infection par des Ad, ceci aussi bien pour induire une réponse en anticorps neutralisants qu'une réponse à médiation cellulaire (Russell, 2009). L'hexon possède des régions hypervariables ciblées par les anticorps neutralisants (Russell, 2009). La fibre et le penton portent eux aussi des épitopes reconnus par des anticorps neutralisants (Hong et al., 2003; Stallwood et al., 2000). Cette réponse en anticorps est un obstacle pour utiliser les AdV dans des immunisations répétées et sont générés après une seule immunisation (Bradley et al., 2012). En effet la neutralisation des vecteurs avant une entrée dans la cellule diminuera l'expression du transgène (Russell, 2009; Tatsis et Ertl, 2004).

L'hexon porte aussi de nombreux épitopes pouvant induire une réponse cellulaire en étant reconnus par des lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Leen et al., 2008). Une réponse minime a été mesurée contre les autres protéines de la capside (Russell, 2009).

1.3.5.2 Immunité pré-existante contre le vecteur

La proportion de la population mondiale ayant été exposée à des Ad du groupe C et ayant développé une immunité aux Ad varient de 40 à 95 % selon les zones géographiques (Arnberg, 2009). Des études épidémiologiques récentes au niveau mondial démontrent que l'Ad5 est l'un des sérotypes présentant la plus grande fréquence en anticorps sériques neutralisants chez les personnes testées (Barouch et al., 2011; Mast et al., 2010). L'impact de cette immunité pré-existante sur la réponse cellulaire générée contre un antigène exprimé par un AdV a été mis en évidence dans

une étude clinique de phase II conduite pour tester un vaccin anti-VIH à base d'Ad5 par la compagnie Merck Frosst et appelée «STEP» dans la littérature. Dans cette étude, des sujets vaccinés sont devenus séropositifs avec une plus grande incidence que des sujets ayant reçus un placebo. Ces deux populations possédaient une immunité pré-existante contre les Ad5 (Buchbinder et al., 2008; McElrath et al., 2008). Suite à ces observations des études plus approfondies sur ce vaccin ont montré que l'immunité pré-existante n'empêche pas d'établir une réponse des lymphocytes T CD8+ contre le VIH (Steffensen et al., 2012), mais elle influence la réponse Th1 et Th2 en réduisant globalement la réponse cellulaire contre le VIH (Pine et al., 2011).

1.3.6 Stratégies pour améliorer l'utilisation de ces vecteurs

1.3.6.1 Les adénovirus réplcatifs non disséminatifs

C'est une délétion de la région précoce E1 (E pour early) du génome qui empêche la réplication virale et qui a permis de générer les vecteurs AdV de première génération évitant ainsi la dissémination des virus réplcatif dans l'organisme et dans l'environnement (Tatsis et Ertl, 2004). Pour augmenter l'expression de ces vecteurs, l'équipe du Dr. B. Massie a développé des AdV de type 5 de seconde génération, réplcatif mais non disséminatif (Bourbeau et al., 2007). Pour conserver la capacité réplcative du génome de l'AdV, la région E1a a été conservée. Par conséquent, le nombre de copies du gène d'intérêt (transgène) est multiplié et l'expression du transgène est augmentée (Bourbeau et al., 2007). La réplication de ces vecteurs a permis d'augmenter l'efficacité de thérapie anti-cancer (Bourbeau et al., 2007). Il est aussi possible que la réplication de ces vecteurs augmenterait la présentation antigénique d'un transgène dans le cadre d'une utilisation en vaccination. Un autre avantage de ce système vectoriel est que la production de nouvelles particules virales infectieuses est impossible parce que le gène de la protéase (PS) est délété. La protéase est nécessaire à l'assemblage des particules virales pendant la phase tardive

de réplication du virus (Bourbeau et al., 2007). La région E3 a aussi été supprimée car des études ont démontré que les protéines exprimées avaient un effet immunosuppresseur non désiré (Krajcsi et al., 1996; Sparer et al., 1996).

1.3.6.2 Utilisation de sérotypes rares et AdV chimériques

Pour éviter les effets de l'immunité pré-existante, des AdV ont été produits à partir de sérotypes ayant une faible prévalence comme les Ad35 et Ad26 (Lasaro et Ertl, 2009). Des sérotypes d'Ad simien (Bangari et Mittal, 2006; Lasaro et Ertl, 2009), canin (Zhou et al., 2010b), porcin (Patel et al., 2010) ou bovin (Singh et al., 2008) ont également été employés dans des études vaccinales précliniques.

Une autre alternative envisagée est la modification des capsides de l'Ad5 en construisant des AdV possédant certaines protéines structurales provenant de sérotypes différents (Lasaro et Ertl, 2009). Ainsi, des Ad5 chimériques possédant les régions hypervariables de l'hexon de l'Ad48 ont été développés (Roberts et al., 2006). Des Ad5 avec la fibre de l'Ad35 sont un autre exemple d'AdV chimériques (Nanda et al., 2005).

1.3.6.3 Voie d'administration mucosale

Les voies d'administration mucosales peuvent limiter l'impact des anticorps neutralisants présents dans le sérum. En effet, l'utilisation de la voie intranasale, pour administrer des vaccins contre le virus Ébola avec des Ad5, permet d'éviter les effets de l'immunité pré-existante contre les Ad (Croyle et al., 2008; Richardson et al., 2011).

1.3.6.4 Stratégies vectorielles combinatoires

Pour limiter les effets de l'immunité induite par les AdV dans des immunisations répétées, des stratégies vectorielles combinatoires ont été employées. Les AdV ont été employés en combinaison avec soit des vecteurs ADN (Casimiro et al., 2003; Houghton, 2011; Khanam et al., 2007; Mascola et al., 2005; Sun et al., 2011; Vinner et al., 2003), soit avec des VLP (Zhou et al., 2011). Des rappels ont aussi été faits en employant des AdV mais en utilisant des sérotypes différents. Ainsi des AdV de sérotype 5 ont été employés en combinaison avec des AdV de sérotypes 26 ou bien 35 (Liu et al., 2008; Shott et al., 2008).

1.4 La flagelline de *Salmonella typhimurium*

1.4.1 Flagelline : structure et interaction avec le système immunitaire

Le filament des flagelles permet la mobilité des bactéries Gram-négatives et certaines Gram-positives. C'est un polymère constitué par une seule sous-unité, la flagelline (Miao et al., 2007; Yonekura et al., 2003; Yonekura et al., 2005). Lorsqu'elle n'est pas polymérisée, elle est l'une des rares protéines à avoir plusieurs PAMP. Lors d'une infection des épithéliums, les bactéries sécrètent la flagelline monomérique pour permettre l'adhésion, l'invasion et causer des dommages aux cellules épithéliales (Sierro et al., 2001). Les flagellines les plus étudiées sont celles de *S. typhimurium* (appelées FliC ou FljB) et de *L. pneumophila* (Fla) (Miao et al., 2007).

La flagelline est une protéine de 55 kDa et possède la forme structurale de la lettre majuscule grecque gamma (Γ). Elle est composée de quatre domaines : D0, D1, D2 et D3 (Yonekura et al., 2003; Yonekura et al., 2005). La structure tertiaire de la flagelline est présentée dans la figure 1.9 a. D0 et D1 forment la base du Γ . Ces deux domaines, composés par des hélices α , vont permettre la polymérisation en interagissant avec ces mêmes domaines appartenant à d'autres flagellines, ce qui est présenté dans la figure 1.9 b et c. Dans le filament tous les domaines D0 et D1 se retrouvent cachés au centre tandis que les domaines globulaires D2 et D3, qui forment la barre transversale du Γ , se retrouvent exposés à la surface du filament du flagelle (Yonekura et al., 2003; Yonekura et al., 2005). Les domaines D2 et D3 présentent une grande variabilité de leurs séquences entre espèces de bactéries.

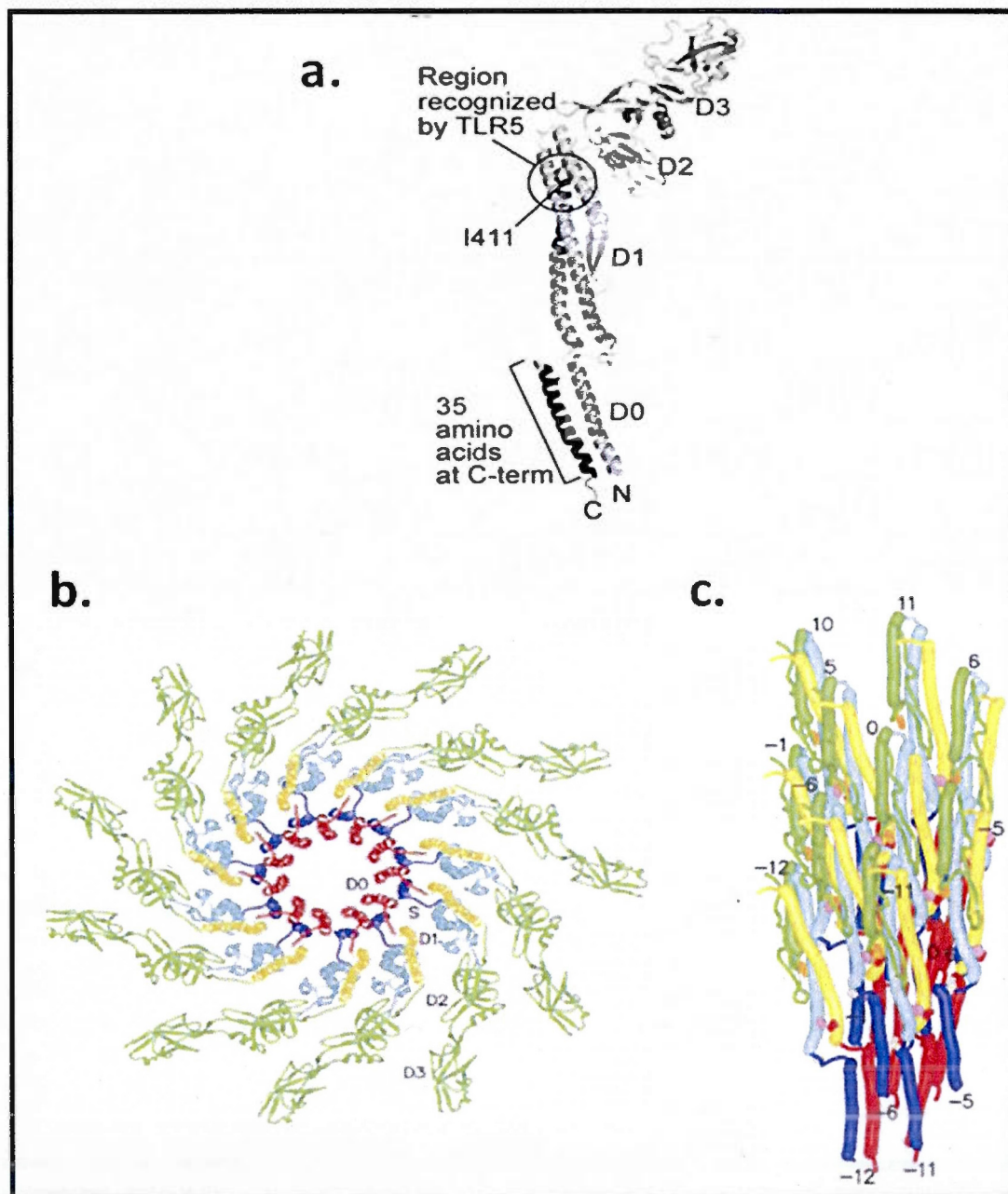


Figure 1.9 : Modélisation de la structure de la flagelline.

Une schématisation de la structure tertiaire de la flagelline de *L. pneumophila* est présentée en (a.). Les sites de liaisons au TLR sur le domaine D1 et le site de 35 acides aminés interagissant avec l'IPAF sont mis en évidence (Lightfield et al., 2008). La structure du filament du flagelle formé par un polymère de flagelline de *S. typhimurium* est présentée selon une vue transversale en (b.) et selon une vue longitudinale du filament en (c.) (Yonekura et al., 2003).

Comme ils sont exposés au système immunitaire lorsque les bactéries pathogènes envahissent un organisme, ils sont la cible d'anticorps générés chez l'hôte (Lightfield et al., 2008). Il est à noter que *S. typhimurium* utilise un mécanisme de variation antigénique pour échapper à ces anticorps en exprimant alternativement deux variantes de la flagelline, FliC ou FljB (Miao et al., 2007). Par contre les domaines D0 et D1 qui sont masqués sont très conservés parmi les flagellines des bactéries Gram-négatives (Donnelly et Steiner, 2002; Lightfield et al., 2008; Miao et al., 2007). Ce sont sur ces domaines que les sites de liaison aux PRR ont été identifiés et présentés dans la figure 1.9 a. Plus précisément, 13 résidus du domaine D1 forment le site de liaison de la flagelline avec le TLR5 lorsque celle-ci est retrouvée dans le milieu extracellulaire (Smith et al., 2003). Il est à noter que ce site est aussi nécessaire à la polymérisation pour la formation du filament et donc nécessaire pour une bonne mobilité des bactéries (Donnelly et Steiner, 2002). Lorsque la flagelline se retrouve dans le cytosol des cellules myéloïdes infectées, c'est une séquence de 35 acides aminés en C-terminal du domaine D0 qui interagit avec l'IPAF (pour «ICE-protease activating factor») parfois par l'intermédiaire de NAIP5 pour certaines flagellines. Ces récepteurs appartiennent tous deux à la famille des NLRs (Lightfield et al., 2008). Cette séquence a tout d'abord été caractérisée sur la flagelline de *L. pneumophila*. D'autres flagellines interagissent avec l'IPAF comme celle de *S. typhimurium* (Mariathasan et Monack, 2007).

Il est intéressant de souligner que deux composantes indépendantes de l'immunité innée convergent pour la reconnaissance de la même molécule microbienne. Cette redondance est aussi observée avec les TLR7 (Diebold et al., 2004) et TLR8 (Heil et al., 2004) qui reconnaissent l'ARN viral simple brin à l'intérieur des endosomes et avec RIG-I et MDA5 (comme indiqué dans la figure 1.4) qui répondent aussi à l'ARN viral mais dans le cytoplasme (Fujita et al., 2007). De plus, la réponse induite suite à la liaison de la flagelline sur le TLR5 est différente de celle générée par l'IPAF. Les différentes cytokines et chimiokines produites suite à une stimulation

par la flagelline sont listées dans le tableau 1.9. Les deux types de voies de reconnaissance de la flagelline conduisent à la génération de signaux pro-inflammatoires. Cependant lorsque la flagelline est intracellulaire le signal est plus fort et se traduit par la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18. Les deux récepteurs PRR peuvent ainsi discriminer les bactéries selon leur virulence. Si la flagelline se retrouve dans le cytosol des cellules myéloïdes, cela signifie que les bactéries sont invasives et plus dangereuses que celles qui restent dans le milieu extracellulaire et dont la flagelline est détectée seulement par le TLR5 (Miao et al., 2007).

Tableau 1.9 : Liste de cytokines et chimiokines produites suite à l'activation du TLR5 ou de l'IPAF par la flagelline sur des cellules épithéliales ou des cellules myéloïdes

Cytokines et chimiokines produites suite à l'activation de récepteurs de l'immunité innée par la flagelline :		
	TLR5	IPAF
Cellules dendritiques et Macrophages	IL-6, IL12p40 (Uematsu et al., 2006) TNF- α (Zeng et al., 2006) CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL2, CCL3, CCL4 (Means et al., 2003) CCL5, macrophage inflammatory proteins, (MIP-1 α and MIP-1 β), (Moynagh, 2005)	IL-1 β , IL-18 (Mariathasan et al., 2004; Miao et al., 2007)
Cellules épithéliales	IL-8 (Rhee et al., 2004) CCL20 (Sierro et al., 2001)	Non déterminé

1.4.2 Flagelline : interaction avec le TLR5 et voies de signalisation

Le TLR5 est grandement exprimé par les cellules intestinales épithéliales, par les cellules dendritiques et par les macrophages (Rhee et al., 2005). Dans l'intestin, le TLR5 est localisé sur la surface basale des entérocytes (Gewirtz et al., 2001a). Il n'est pas exprimé sur la surface apicale où il serait en contact avec les bactéries pathogènes et commensales présentes dans la lumière intestinale. Ceci permet de restreindre l'activation du TLR5 aux bactéries qui ont traversé l'épithélium et qui représentent un danger (Gewirtz et al., 2001a; Gewirtz et al., 2001b; Rhee et al., 2005). Un modèle *in vitro* a mis en évidence que la flagelline monomérique est transloquée au pôle basal des entérocytes lors d'une colonisation de cellules épithéliales par *S. typhimurium*. À cet endroit elle active la réponse innée via le TLR5 des entérocytes ou des cellules dendritiques qui sont également présentes (Gewirtz et al., 2001b; Rhee et al., 2005).

Suite à la liaison avec la flagelline, le TLR5 se dimérise. Il y a un recrutement du Myd88 (pour «Myeloid differentiation primary response gene (88)») par son domaine TIR (pour «Toll/Interleukine-1 Receptor-like Domain») intracellulaire (Rhee et al., 2004; Rhee et al., 2006). Le MyD88 est appelée molécule adaptatrice car de son recrutement découle une cascade de réactions (phosphorylation, interactions protéine-protéine) qui permettent la transduction du signal et qui aboutissent finalement à l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui régule l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire de l'hôte (Mogensen, 2009).

Il a été montré par des études avec des souris «knock-out» que la voie de signalisation du TLR5 ainsi que du TLR7 et TLR9 est uniquement dépendante du MyD88 (Mogensen, 2009; Rhee et al., 2004; Rhee et al., 2006; Takeda et Akira, 2004), contrairement à celles des TLR1, TLR2, TLR4 et TLR6 qui sont aussi dépendante de TIRAP (pour «TIR domain-containing adapter protein») (Hornig et al., 2002). Le TLR3 possède par contre une voie de signalisation dépendante de TRIF

(pour «TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ») et indépendante du Myd88 (Akira et al., 2003). Cette voie est aussi employée par le TLR4 et conduit par contre à l'activation du facteur de transcription IRF-3 (pour «Interferon regulatory factor 3») qui lui régule l'expression des interférons de type I (Akira et al., 2003; Mogensen, 2009). Ces voies de signalisation sont regroupées dans la figure 1.10, ci-après.

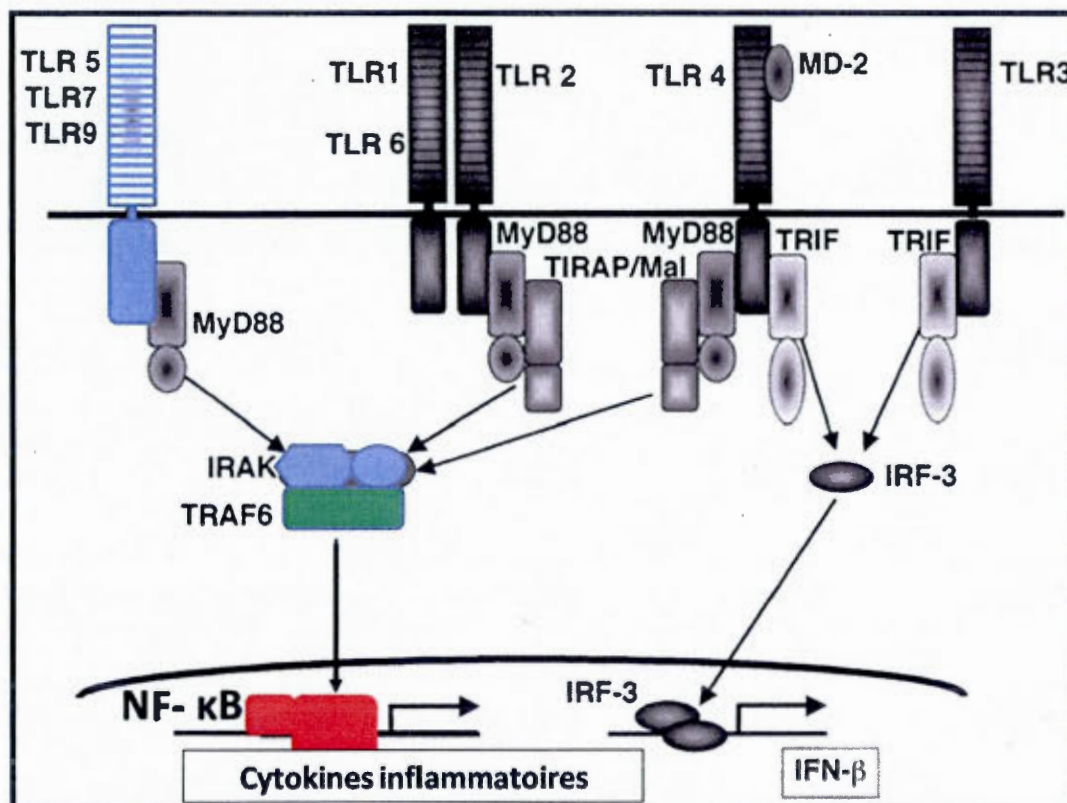


Figure 1.10 : Transduction du signal après la liaison des PAMPs aux TLRs.

Les différentes voies de signalisation avec les adaptateurs après activation des TLRs sont indiquées. L'activation du TLR5 mène à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et à l'expression de cytokines inflammatoires. Cette voie de signalisation est dépendante de l'adaptateur MyD88 (Akira et al., 2003).

1.4.3 Flagelline : interaction avec l'inflammasome et voies de signalisation

Des NLRs sont impliqués dans la reconnaissance de molécules bactériennes introduites dans le cytosol de cellules hôtes (Lightfield et al., 2008; Miao et al., 2007). Le site de reconnaissance par l'IPAF de la flagelline est situé dans la séquence des 35 acides aminés situés en position C-terminale. Cette séquence est conservée chez les bactéries Gram négatives (Lightfield et al., 2008) comme le montrent plusieurs exemples illustrés dans la figure 1.11.

	441		470
<i>L. pneumophila</i> (Lp)...	EMASLTKNQILQQAGTAMLAQANSLPQSV	LSLLGR	
<i>P. aeruginosa</i> (Pa) ...	ETAALSKNQVLQQAGTAILAQANQLPQAV	LSLLR-	
<i>S. flexneri</i> (Sf) ...	EVSNMSKAQIIQQAGNSVLAKANQVPQQV	LSLLQG	
<i>S. typhimurium</i> (St)...	EVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNV	LSLLR-	
Identical(*)	*	* * * * *	** ** * * * * *

Figure 1.11 : Comparaison de la séquence des 35 acides aminés en C-terminal de la flagelline de différentes bactéries Gram négatives.

Les séquences des 35 acides aminés situés en C-terminal des flagellines de *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* et *Salmonella typhimurium* sont comparées (Lightfield et al., 2008). Les leucines en gras sont essentielles dans la reconnaissance des flagellines par l'IPAF dans les macrophages (Lightfield et al., 2008).

Dans le macrophage, cette reconnaissance mène à l'activation de la caspase-1 après l'assemblage d'un complexe protéique de 700 kDa connu sous le nom d'inflammasome (Mariathasan et Monack, 2007; Ogura et al., 2006; Petrilli et al., 2007; Petrilli et al., 2005; Sutterwala et al., 2007; Watanabe et al., 2008). La caspase-1 est nécessaire pour la maturation et la sécrétion d'IL-1 β et IL-18 (Lamkanfi et al., 2007; Mariathasan et al., 2004; Martinon et Tschopp, 2004; Yu et Finlay, 2008). Ces cytokines initient une réponse inflammatoire en activant l'expression de facteurs d'adhésion sur les cellules endothéliales qui favoriseront la migration des leukocytes au site de l'infection (Mariathasan et Monack, 2007). L'activation de l'inflammasome a aussi pour conséquence la mort de la cellule ce qui est un moyen de limiter la multiplication des bactéries invasives pathogènes au sein de la cellule hôte (Mariathasan et Monack, 2007; Mariathasan et al., 2004). La caspase-1 est la molécule effectrice centrale de l'inflammasome. Elle est d'abord synthétisée sous forme inactive (pro-caspase-1) et pour être active, elle est clivée en deux sous-unités p20 et p10 qui forment un hétérotétramère (Mariathasan et Monack, 2007). Elle est activée grâce à la protéine ASC (pour «apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD») qui s'est complexée à l'IPAF (Martinon et Tschopp, 2004). L'activation de l'inflammasome par la flagelline a été schématisée par Mariathasan et Monack (Mariathasan et Monack, 2007) et est présentée dans la figure 1.12.

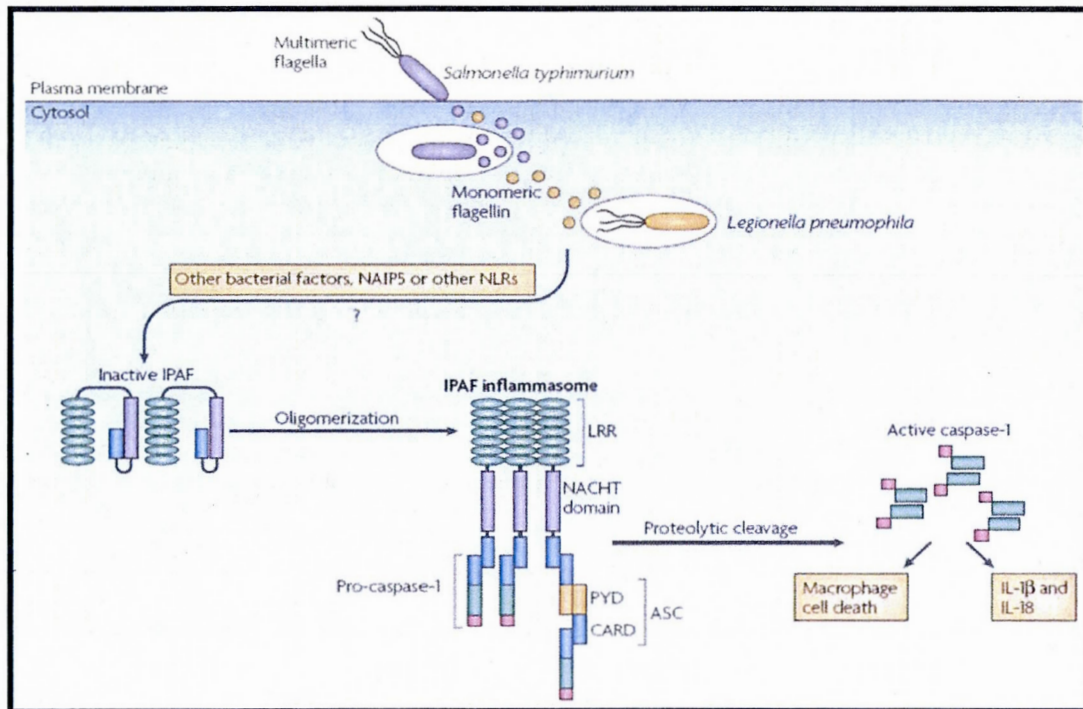


Figure 1.12: Activation de l'inflammasome du macrophage par la flagelline monomérique intracellulaire.

L'IPAF est essentiel pour l'activation de la caspase-1 par les flagelline de *S. typhimurium* et *L. pneumophila* pour induire la maturation et la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 et pour induire la mort du macrophage (Mariathasan et Monack, 2007). Dans le cas de *L. pneumophila*, NAIP5 (pour «neuronal apoptosis inhibitor protein 5») est nécessaire en plus de l'IPAF pour activer la caspase-1 (Lightfield et al., 2008). Dans le cas de *S. typhimurium*, l'implication d'autres NLR reste à être étudiée (Mariathasan et Monack, 2007).

1.4.4 Usage de la flagelline comme adjuvant dans des études de vaccination

Les molécules pouvant générer une réponse immunitaire innée ont été employées en vaccinologie comme adjuvant pour leurs capacités immunomodulatrices (Reed et al., 2009; Schwarz et al., 2003). Les premières études démontrant un effet adjuvant de la flagelline datent des années 1990 (McEwen et al., 1992; Mizel et Bates, 2010). Utilisée en mélange ou en fusion avec des peptides ou des protéines, la flagelline a démontré des effets adjuvants permettant d'augmenter

les réponses immunitaires en anticorps et à médiation cellulaire (Mizel et Bates, 2010).

Dans la grande majorité des études, la capacité de la flagelline à se lier au TLR5 est visée. En effet, la flagelline et les antigènes étudiés sont administrés de manière extracellulaire chez l'hôte (Mizel et Bates, 2010). La protéine GFP (pour «Green Fluorescent Protein») et l'OVA sont deux antigènes modèles employés pour étudier les capacités adjuvantes de la flagelline (Cuadros et al., 2004; Huleatt et al., 2007; Salman et al., 2009; Sarti et al., 2011). Les principaux pathogènes visés dans des études de vaccins utilisant la flagelline comme adjuvant sont le virus de la grippe (Ben-Yedidia et Arnon, 1998; Huleatt et al., 2008; McEwen et al., 1992; Skountzou et al., 2010; Song et al., 2009), le protozoaire *Plasmodium* (Bargieri et al., 2010; Bargieri et al., 2008; Braga et al., 2010) et la bactérie *Yersinia pestis* (Bates et al., 2008; Honko et al., 2006; Mizel et al., 2009). En plus d'être reconnue par le TLR5, la flagelline a aussi l'avantage de pouvoir être utilisée par différentes voies d'administration, notamment par les voies intranasale (Honko et al., 2006; Lee et al., 2006) et orale (Salman et al., 2009; Sarti et al., 2011). Il est à noter que FljB, flagelline de *S. typhimurium*, fusionnée à des antigènes du virus de la grippe a été testée dans des études cliniques de phase I chez l'homme (Taylor et al., 2011; Turley et al., 2011). Fait intéressant, la flagelline a montré une meilleure efficacité que l'Alum (Huleatt et al., 2008) ou l'adjuvant complet de Freund (Huleatt et al., 2007) dans des immunisations sous-cutanées.

D'autre part, peu d'études ont employé la flagelline dans des vaccins ADN (Applequist et al., 2005). Ces travaux ont montré un effet adjuvant de la flagelline lorsque administrée via un vecteur plasmidique en mélange avec des plasmides exprimant des antigènes. Une étude récente a montré un effet adjuvant de la flagelline FliC de *S. typhimurium* dont la séquence a été insérée dans le génome d'un vecteur VSV recombinant disséminatif (Ahmed et al., 2010). Dans cette étude, la flagelline

est produite de manière intra-cellulaire pendant le cycle infectieux du vecteur viral mais n'est ni introduite dans les particules virales produites ni fusionnée à une protéine du VSV. Cependant son expression permet d'augmenter la réponse en anticorps contre le VSV (Ahmed et al., 2010). La flagelline a aussi été administrée par des AdV mais dans un contexte de thérapie anti-cancer (Tosch et al., 2009).

Pour conclure, le tableau 1.10 résume l'emploi de la flagelline comme adjuvant dans des études de vaccinations contre des agents infectieux ou anti-cancer en fonction de la souche bactérienne dont elle provient, de son utilisation en protéine de fusion ou bien en mélange avec un antigène et la voie d'administration employée.

Tableau 1.10 : Utilisation de la flagelline comme adjuvant dans des études de vaccinations.

Nom de la flagelline	Souche bactérienne d'origine	Utilisée en protéine de fusion (F) ou en mélange (M)	Administrée de		Voie d'administration	Références
			manière extracellulaire (E) ou intracellulaire (I)			
FlaA	<i>Listeria monocytogenes</i>	F	E	Intramusculaire	(Schulke et al., 2011)	
		M	I (AdV)	Intratumorale	(Tosch et al., 2009)	
FlaA	<i>L. pneumophila</i>	F	E	Intrapéritonéale	(Xu et al., 2011)	
FlaB	<i>Vibrio vulnificus</i>	M	E	Intranasale	(Lee et al., 2006)	
		F	E	Intranasale	(Hong et al., 2012; Nguyen et al., 2011)	
FljB	<i>S. typhimurium</i>	M	E	Orale	(Salman et al., 2009; Sarti et al., 2011)	
		M	E	Intranasale	(Pino et al., 2005)	
		F	E	Sous-cutanée	(Cuadros et al., 2004; Huleatt et al., 2007; Huleatt et al., 2008)	
		F	E	Intramusculaire	(Taylor et al., 2011; Turley et al., 2011)	
FliC	<i>S. typhimurium</i>	F	E	Intramusculaire	(Delaney et al., 2010)	
		F	E	Sous-cutanée et intranasale	(Bargieri et al., 2010; Bargieri et al., 2008; Braga et al., 2010)	
		F	E	Orale	(Cookson et Bevan, 1997)	
		F	E	Intranasale et Intramusculaire	(Mizel et al., 2009)	
		F	E	Sous-cutanée	(Camacho et al., 2011; Song et al., 2009)	
		M	E	Sous-cutanée	(Bargieri et al., 2010; Bargieri et al., 2008; Braga et al., 2010)	
		M	E	Intranasale	(McSorley et al., 2002)	
		M	E	Intraveineuse	(Bates et al., 2008; Shi et al., 2012; Skountzou et al., 2010)	
		M	E	Intranasale	(Chuang et al., 2012)	
		M	E	Intramusculaire		
		M	E	Intranasale		
		M	I (vaccin ADN)	Intradermale	(Applequist et al., 2005)	
		M	I (vecteur VSV)	Intranasale	(Ahmed et al., 2010)	

CHAPITRE II

ROTAVIRUS-SPECIFIC IMMUNE RESPONSE IN MICE IMMUNIZED WITH REPLICATING BUT NON DISSEMINATING ADENOVIRUS VECTORS EXPRESSING HUMAN ROTAVIRUS STRUCTURAL PROTEINS

Aurélie Girard^a, Élodie Roques^a, Marie-Claude St-Louis^a,
Bernard Massie^{b,c} and Denis Archambault^{a,*}.

^a University of Quebec at Montreal, Department of Biological Sciences, P.O. Box 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

^b National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montréal, Québec, H4P 2R2, Canada.

^c University of Montreal, Department of Microbiology and Immunology, CP 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada.

Ce chapitre présenté sous forme d'article scientifique a été accepté pour publication dans la revue *Molecular Biotechnology*. La conception, réalisation et l'analyse des expériences ont été faites par l'auteur de cette thèse. La rédaction du manuscrit ainsi que le montage des figures ont été réalisés par l'auteur de cette thèse. Élodie Roques et Marie-Claude St-Louis ont été impliquées respectivement dans les essais de lymphoprolifération et dans la production des adénovirus recombinants. Le Docteur Bernard Massie a développé le système d'adénovirus recombinants. Le Docteur Denis Archambault a participé à la conception des expériences, a supervisé le projet et corrigé le manuscrit. Tous les auteurs ont discuté des résultats, révisé et approuvé le manuscrit final. La référence de cet article se retrouve à la fin de cette thèse.

2.1 Abstract

The aim of this study was to evaluate the usefulness of replicating but non disseminating adenovirus vectors (AdVs) as vaccine vector using human rotavirus (HRV) as a model pathogen. HRV VP7, VP4 or VP4 Δ (N-terminal 336 amino acids of VP4) structural proteins as well as the VP4 Δ ::VP7 chimeric fusion protein were expressed in mammalian cells when delivered with the AdVs. A preliminary experiment demonstrated that VP4 Δ was able to induce an HRV-specific IgG response in BALB/c mice inoculated intramuscularly with AdVs expressing the rotaviral protein. Moreover, an AdV-prime/plasmid DNA-boost regimen of vectors resulted in VP4 Δ -specific antibody (Ab) titers \sim 4 times higher than those obtained from mice immunized with AdVs alone. Subsequently, the various HRV protein-encoding AdVs were compared using the AdV-prime/plasmid DNA-boost regimen. Higher IgG and IgA responses to HRV were obtained when VP4 Δ ::VP7 fusion protein was used as an immunogen as compared to VP7 or VP4 alone or to a mix of both proteins delivered independently by AdVs. A synergetic effect in terms of Ab was obtained with VP4 Δ ::VP7. In conclusion, this work demonstrated for the first time the suitability of using replicating but non disseminating AdVs as vaccine vector and the VP4 Δ ::VP7 fusion protein as an immunogen for vaccination against HRV.

Keywords: Rotavirus, replicating non disseminating adenovirus, VP4, VP7, neutralizing antibodies.

2.2 Introduction

Human rotavirus (HRV) is one of the most important infectious agents worldwide, causing severe dehydrating diarrhea in infants and young children (Soares-Weiser et al., 2010) with roughly 500,000 deaths annually, mostly in developing countries (Boschi-Pinto et al., 2008; Chen et al., 2012b). In 1998, RotaShield was the first tetravalent live-attenuated vaccine which however was withdrawn from use because of a number of intestinal intussusception cases in vaccinated infants (Franco et al., 2006). Since 2006 two live-attenuated HRV vaccines (RotaTeq and Rotarix) have been approved. Despite rigorous safety tests and good protection correlates, live vaccines still have potential risks including reversion of virulence (Plotkin, 2009).

Protection against rotavirus infection still lacks a clear understanding (Angel et al., 2012; Franco et al., 2006; Plotkin, 2010; Ward et al., 2010). Components of the immune system including neutralizing antibodies (NAbs), non-neutralizing antibodies (Abs), secretory Abs in the intestine and cell-mediated immune (CMI) response have all been proposed as correlates of protection (Franco et al., 2006; Plotkin, 2010). However, total serum rotavirus-specific IgAs and NAbs are currently considered as the best markers of protection against rotavirus (Angel et al., 2012; Franco et al., 2006).

The two major viral surface structural proteins termed VP4 and VP7 are involved in HRV cell binding and entry (Aoki et al., 2011; Pesavento et al., 2006). These proteins are the main targets of the host immune system for the induction of NAbs (Franco et al., 2006) and, thereof, have been selected by many investigators for the development of subunit vaccines (Choi et al., 1998; Qiao et al., 2009; Wigdorovitz et al., 2004). However, unlike live vaccines, subunit vaccines are often

inefficient at inducing optimal immune response (Plotkin, 2009). As a result, the use of adjuvants (Reed et al., 2009) and/or of vectors like viral vectors (Robert-Guroff, 2007) to induce optimal immune response is required.

Adenovirus vectors investigated for years as part of gene therapy applications are among the most exploited viral vectors for vaccine purposes (Robert-Guroff, 2007; Rollier et al., 2011). In 2008, the failure of Merck's STEP clinical trial using replicating-defective adenovirus vector for human immunodeficiency virus (HIV) vaccine has enlighten some weaknesses of such a system (Wilson et Watkins, 2009). Therefore many efforts were done to improve the efficacy of these vectors (Houghton, 2011; Liu, 2010; Sun et al., 2011). One of them relies on a strategy to enhance the immunogenicity of replication-defective adenovector -based HIV vaccine by complementing for expression of the adenovirus E1 gene through DNA inoculation allowing virus replication *in vivo* (Sun et al., 2011). However the complementation strategy with the simultaneous use of two different vectors is more likely limiting for vaccine administration and efficiency.

A replicating but non disseminating adenovector (AdV) has been described (Bourbeau et al., 2007). This vector is based on a replication-competent platform consisting of an human adenovirus type 5 with a deletion in the protease (PS) gene (Oualikene et al., 2000) the product of which is necessary for viral assembly (Russell, 2009). In the absence of the PS gene, the AdV replicates its DNA normally in infected cells but fails to form infectious particles, thus preventing its dissemination in the host environment (Oualikene et al., 2000; Russell, 2009). Bourbeau *et al.* (2007) demonstrated that such AdVs not only increased transgene expression in infected cells when compared to non-replicating adenovectors, but were also as efficient as a replicating disseminating adenovector system in cancer therapy (Bourbeau et al., 2007).

In this study, the AdVs were evaluated as a proof-of-concept vaccine vector using HRV VP4 and VP7 proteins as immunogens. Since the assembly of rotaviral epitopes have been shown to improve immune responses (Istrate et al., 2008; Kovacs-Nolan et Mine, 2006), we also sought to fuse a truncated form of VP4 (VP4 Δ) with VP7 and evaluate the immunogenicity of the resulting fusion protein delivered by AdVs.

2.3 Material and methods

2.3.1 Cell cultures

The human alveolar adenocarcinoma A549, human embryonic kidney 293A (HEK 293A) and simian epithelial kidney MA104 cell lines were maintained in Dulbecco minimal essential medium with 8% fetal bovine serum (FBS) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The 293-PS-CymR cell line, a clone derived from the HEK 293A cells that was developed by Bernard Massie, was propagated as previously described (Mullick et al., 2006; Oualikene et al., 2000).

2.3.2 Generation of gene constructs for expression in Mammalian cells

VP7- and VP4-encoding genes from the HRV Wa strain (GenBank accession no. AAA4734 and AAA66953, respectively) were optimized for codon usage in mammalian cells and synthesized through GeneArt services (Regensburg, Germany). VP7- [326 amino acids (aa)], VP4- (776 aa), VP4Δ- (N-terminal 336 aa of VP4) and VP4Δ::VP7-encoding sequences were amplified by PCR and cloned into pcDNA3.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) as described elsewhere (Zhong et al., 2006). HEK 293A cells (plated in wells of six-well plates at a density of 5×10^5 cells per well) were transfected with PolyFect transfection reagent (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) with each plasmid construct and incubated for 48 h. Total cell protein concentrations were quantified with a detergent-compatible protein assay (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada).

2.3.3 Construction of AdVs

AdVs were constructed using the AdenoVator system (MP Biomedicals, Irvine, CA). GFP-, VP7-, VP4-, VP4Δ- and VP4Δ::VP7-encoding sequences were first subcloned into the *Bgl*III restriction site of the modified shuttle vector

pAdenoVator-CMV5(CuO)-IRES-E1A (Bourbeau et al., 2007) in which the early domain 1A (E1A) sequence is inserted downstream of an internal ribosome entry site (IRES) to be co-expressed with the transgene. Expression of adenovirus E1A enables viral DNA replication, thereby increasing viral genome copy number in infected cells (Russell, 2009). Each construct was confirmed by DNA sequencing. The various recombinant AdVs (AdV Δ PS-CuO-transgene-IRES-E1A) were generated using the AdEasy system (MP biomedical) with the AdV Δ PS backbone according to the manufacturer's protocol. Recombinant AdVs were propagated and produced at high titers in 293-PS-CymR cells. They were then purified by double cesium chloride (CsCl) gradient as described (Bourbeau et al., 2007). The recombinant AdV titers were determined and calculated as the median tissue culture infective dose (TCID₅₀) per milliliter.

AdV-delivered protein expression was monitored in A549 cells that were plated in wells of six-well plates at a density of 5×10^5 cells per well and transduced with each recombinant AdV at an MOI of 10. After 48 h of incubation, cell extracts were prepared and total cell protein concentrations were determined as described above.

2.3.4 Recombinant protein production

Recombinant VP4 Δ and VP7 Δ (amino acids 84–332 of VP7) proteins were produced in *E. coli* and purified as previously described (Bergeron-Sandoval et al., 2011). Briefly, genes encoding VP4 Δ and VP7 Δ proteins were cloned into pTrcHisB expression vector (Invitrogen) and proteins were purified on Ni-NTA-His-Bind® resin (Novagen, Madison, WI, USA) under denaturing conditions according to the manufacturer's manual. Proteins were dialyzed against a phosphate-buffered saline solution (PBS, pH 7.3), and qualitatively evaluated by SDS-PAGE followed by immunoblotting using Horseradish peroxidase (HRP)-coupled goat anti-His Abs

(Qiagen). The identity of the proteins was confirmed by MALDI time-of-flight tandem mass spectrometry (McGill University and Genome Quebec Innovation Centre), using the MASCOT software (Matrix Science Inc., Boston, USA). Purified His-tagged VP4 Δ and VP7 Δ proteins were quantified as above and stored at -80°C for further use as antigens in the immunological tests.

2.3.5 Western blot assay

For each sample, 50 μ g of total cell extract prepared as described (Gomez Corredor et Archambault, 2009) were fractionated on 12% SDS-polyacrylamide gels, electroblotted onto a nitrocellulose membrane and probed with a 1:10,000 dilution of either rabbit VP7- (Bergeron-Sandoval et al., 2011), mouse monoclonal VP8*- (for VP4 and VP4 Δ detection) kindly provided by Dr. Harry B. Greenberg (Stanford University) or AdV-E1A gene product-specific Abs (Millipore, Billerica, MA). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) immunostaining (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was used as a loading control. Detection of the proteins was performed as previously described (Bergeron-Sandoval et al., 2011).

2.3.6 Rotavirus Wa strain propagation and purification

Propagation and titration of the human rotavirus (HRV) Wa strain (kindly provided by Dr. Dongwan Yoo from the University of Illinois) were performed in MA104 cells as described (Gray et Desselberger, 2000). The virus was purified using CsCl gradients (Gray et Desselberger, 2000) and titered using a Focus Fluorescent Unit assay (FFU) (Coulson et Masendycz, 1990). Virus concentration (μ g/ml) was determined by multiplying OD₂₆₀ x dilution factor x 185 μ g/ml (Gray et Desselberger, 2000).

2.3.7 Immunization of mice

Animal protocols were approved by the University's Animal Protection Institutional Committee according to the regulations of the Canadian Council for Animal Care. Six-week-old female BALB/c mice were purchased from Charles River (St-Constant, QC, Canada). Mice were inoculated intramuscularly in both legs of each mouse with a total volume of 50 μ l per leg with either AdVs or plasmid DNA. Blood samples and spleens were collected as previously described (Girard et al., 2011).

2.3.7.1 Preliminary experiment

In a preliminary experiment, mice of five groups (five mice per group) were immunized on day 0 and on days 14 and 35 post primary immunization (PPI). At each time point, mice of a control group received PBS and mice of the second group received AdV expressing GFP (1×10^8 TCID₅₀ per dose). Mice of the third and fourth groups were inoculated with AdV expressing VP4 Δ (AdV-VP4 Δ) or plasmid DNA (100 μ g per dose) also expressing VP4 Δ (pcDNA3.0-VP4 Δ), respectively. Mice of a fifth group received AdV-VP4 Δ on day 0 and pcDNA3.0-VP4 Δ on days 14 and 35 PPI. Animals were euthanized on day 66 PPI.

2.3.7.2 Experiment 1

Mice of five groups (eight mice per group) were inoculated on day 0 with 1×10^8 TCID₅₀ of AdV and boosted on day 14 with 100 μ g of plasmid DNA expressing the same protein as AdV. Mice received the following immunogens: GFP, VP7, VP4, VP4 Δ , or VP4 Δ ::VP7. An additional plasmid DNA boost was realized five days before euthanasia of animals on day 40 PPI. Preliminary data showed that this final boost increases the *in vitro* spleen lymphocyte proliferation to HRV (not shown).

2.3.7.3 Experiment 2

Four groups of six mice were used. Mice of the first two groups were immunized on day 0 with 2×10^8 TCID₅₀ AdV expressing either GFP (group 1) or VP4Δ::VP7 (group 2) and boosted on days 14 and 35 PPI with 200 µg of plasmid DNA expressing the same proteins. Mice were euthanized on day 40 PPI. Mice of the last two groups of mice received a mix of vectors expressing VP4Δ and VP7 (group 3), or VP4 and VP7, respectively (group 4). Mice of these two groups, namely VP4Δ / VP7 and VP4 / VP7, were injected on day 0 with 1×10^8 TCID₅₀ AdV-VP4Δ and 1×10^8 TCID₅₀ AdV-VP7, or with 1×10^8 TCID₅₀ AdV-VP4 and 1×10^8 TCID₅₀ AdV-VP7, respectively. On days 14 and 35 PPI, mice received the appropriate mix of 100 µg of each recombinant plasmid DNA expressing the same proteins as for AdVs for a total of 200 µg of plasmids.

2.3.8 Indirect Immunofluorescence Assay (IFA)

MA104 cells were plated into wells (1.0×10^4 cells per well) of a 96-well plate and infected the next day with HRV (200 FFU per well). Cells were fixed in PBS-4% formaldehyde for 15 min and blocked for 1 h at 37°C in PBS-5% bovine serum albumin (BSA). The assay was performed using mouse sera as primary Abs and Cy3-coupled anti-mouse IgG secondary Abs (1:1,000), each incubated for 2 h at 37°C. IFA titers were expressed as the Log₂ of the reciprocal of the highest serum dilution producing a positive fluorescent signal.

2.3.9 Indirect ELISA

96-well Costar ELISA plates (Fisher Scientific) were coated overnight at 4 °C with 1 µg recombinant VP4Δ or VP7Δ produced in bacteria (Bergeron-Sandoval et al., 2011) or 100 ng CsCl-purified, UV-inactivated (Caballero et al., 2004) HRV per well diluted in 100 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) to a final volume of

100 μ l. Following a blocking treatment with BSA, Ab titration was performed using 100 μ l of two-fold serial serum dilutions and an incubation time of 2 h at 37°C. HRP-conjugated goat anti-mouse IgG1 (1:10,000), IgG2a (1:5,000) or IgA (1:5,000) (Santa Cruz Biotechnologies) were added for 1 h at 37°C. HRP signal was detected as described (Girard et al., 2011). ELISA titers of serum samples from each individual mouse were expressed as the Log_2 of the last dilution of sample giving a mean OD higher than two-fold the mean OD obtained from negative control mouse serum.

2.3.10 Rotavirus neutralization assay

The virus neutralization test was performed according to the FFU reduction assay (Coulson et Masendycz, 1990; Kovacs-Nolan et Mine, 2006) with modifications. Briefly, serially-diluted heat-inactivated sera were mixed with the virus (250 FFU) in DMEM supplemented with porcine pancreatic trypsin (5 μ g/ml) and incubated at 37°C for 1 h. MA104 cells in 96-well tissue culture plates were infected during 2 h with each of the serum-virus mixtures (two wells per mixture). Cells were then incubated in DMEM supplemented with porcine pancreatic trypsin (5 μ g/ml) and were fixed in PBS-formaldehyde 4% after 18h. Residual infectious virus was detected by IFA using VP4 Δ - and VP7-specific antisera (Bergeron-Sandoval et al., 2011) (1:500) and Alexa green 488 coupled anti-rabbit secondary IgGs (1:1,000) (Invitrogen). The presence of virus-infected cells was detected using a TE-300 inverse microscope (Nikon, Mississauga, Canada) coupled to the confocal MRC-1024ES system (Bio-Rad). NAb titers were expressed as the Log_2 of the reciprocal of the highest serum dilution producing a 50% reduction in FFU. The virus neutralization assays were repeated twice.

2.3.11 Spleen lymphocyte proliferation assay

Spleen white cells from each mouse were prepared as previously described (Girard et al., 2011). Quadruplicate cell cultures were stimulated for 3 days with

CsCl-purified, UV-inactivated HRV (200 ng/ml). Cells were labelled with radioactive H^3 -thymidine incorporated in cell DNA for 24 h prior to cell harvesting (Girard et al., 2011). The lymphocyte proliferation results were expressed as stimulation index (SI) which is the ratio of mean counts per minute (CPM) of cells stimulated with the antigen divided by the mean CPM of cells without antigen.

2.3.12 Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test were carried out for statistical analyses between multiple groups using GraphPad Prism software (Windows Version 5.0, Graphpad Software, Lajolla, CA, USA). Significance was set at $P < 0.05$.

2.4 Results

2.4.1 Expression of VP7, VP4, VP4 Δ , and VP4 Δ ::VP7 constructs in mammalian cells

Sequences encoding GFP, VP7, VP4, VP4 Δ and VP4 Δ ::VP7 proteins were inserted each into AdVs or pcDNA3.0 plasmids. VP4 Δ is a truncated version of VP4 that contains the major neutralizing epitopes of VP4 and the sequence motif for virus attachment to target cells (Graham et al., 2006; Monnier et al., 2006; Pesavento et al., 2006).

Expression of VP7 (38 kDa), VP4 (86 kDa), VP4 Δ (38 kDa), and VP4 Δ ::VP7 (76 kDa) was evaluated by Western blot either in AdV-infected A549 cells (Fig. 2.1A) or in pcDNA3.0-transfected HEK 293A cells (Fig. 2.1B). Molecular weights of the expressed proteins were those predicted for the corresponding genes. However, additional VP4 Δ and VP7 bands were observed in cells treated with the VP4 Δ ::VP7-expressing AdV and DNA plasmid vectors (Fig. 2.1A and B). These bands were attributed to spontaneous cleavage of a fraction of VP4 Δ ::VP7. As expected, 38 kDa and 40 kDa E1A proteins that allow adenoviral DNA replication were detected in the cellular extracts of AdV-infected cells (Fig. 2.1A).

2.4.2 Immunogenicity of HRV VP4 Δ delivered by AdVs

In a preliminary experiment, the single immunogen VP4 Δ was selected to be delivered with AdVs inoculated in mice on days 0, days 14 and 35 post primary immunization (PPI) to ensure the validity of the AdV system (Fig. 2.2). This procedure was also compared with pcDNA3.0-VP4 Δ inoculations. The kinetics of serum IgG responses to HRV, as determined by IFA, is shown in Fig. 2. Although HRV-specific Abs were detected in both groups of mice, the highest Ab levels were observed in the AdV-VP4 Δ -inoculated group. Abs were detected as early as 14 days

PPI in this group and their level was stable for over one month after the last immunization at day 35 PPI. In contrast, Abs were first detected on day 35 PPI in the plasmid DNA-inoculated group and their level slightly decreased one month after the last immunization. No HRV-specific Abs was detected in mice of the PBS- or AdV-GFP-inoculated negative control groups.

One inconvenience of viral vector-based vaccines is the immunogenicity of the vector itself which may limit their use in repeated immunizations. In order to circumvent possible AdV neutralization, prime/boost immunization regimens with AdV and plasmid DNA, respectively, were developed (Houghton, 2011; Sun et al., 2011). Mice of a fifth group, namely the AdV/pcDNA3.0-VP4 Δ group, were then immunized with AdV-VP4 Δ on day 0 and boosted with pcDNA3.0-VP4 Δ on days 14 and 35 PPI (Fig. 2.2). This prime/boost regimen resulted in VP4 Δ -specific Ab levels that were about 4 times higher than those obtained from mice immunized with AdV-VP4 Δ alone from day 35 PPI.

2.4.3 VP7, VP4, VP4 Δ or VP4 Δ ::VP7 immunogens induce HRV-specific Ab responses

The results of the preliminary experiment prompted us to compare the immunogenicity of the VP7, VP4, VP4 Δ , and VP4 Δ ::VP7 proteins administered with the AdV-prime/plasmid DNA-boost regimen. Mice were immunized with AdV on day 0 and boosted with plasmid DNA on days 14 and 35 PPI. On day 40 PPI, the IgG response specific to HRV was evaluated by IFA in individual mouse sera (Fig. 2.3A). While each group of mice had significant levels of HRV-specific IgGs, the highest Ab levels were observed in the VP4 Δ ::VP7 group of mice (Fig. 2.3A). Ab titers in VP4 and VP4 Δ groups of mice were similar and were higher than those of the VP7 group. An indirect ELISA was also performed using either purified HRV (Fig. 2.3B), VP4 Δ (Fig. 2.3C) or VP7 Δ (Fig. 2.3D) recombinant proteins as antigen. While the

highest Ab levels were again observed in the VP4Δ::VP7 group, no significant difference was noted between the VP4, VP4Δ and VP7 groups. This was attributed to the technique itself where mature viral particles were used as antigen such that it may not have detected the IgG response directed to some conformational epitopes exposed on unfolded VP4 proteins present in the infected cells used in IFA.

A second set of experiments was conducted to determine whether VP4Δ and VP7 need to be delivered as a VP4Δ::VP7 fusion protein to obtain optimal antibody response. Mice were immunized on day 0 with AdVs expressing either GPF or VP4Δ::VP7 fusion protein and boosted with the plasmid DNA vectors on days 14 and 35 PPI. Two other groups of mice, namely VP4Δ/VP7 and VP4/VP7, were immunized with a mixture of AdV and subsequently plasmid DNA vectors encoding the proteins separately. Results showed that the IgG responses obtained on day 40 PPI were higher in the VP4Δ::VP7 group than both the VP4Δ/VP7 and VP4/VP7 groups regardless of the antigen used in the ELISA (Fig. 2.3B to D). The immune response was further analyzed in terms of Ab isotypes and IgG subclasses on sera collected from individual mice at day 40 PPI (Fig. 2.4A). Significant levels of serum HRV-specific IgG1 (typical of a Th2 immune response), IgG2a (typical of a Th1 immune response) and IgA were detected by ELISA in each group of animals immunized with the HRV immunogens in both experiments 1 and 2, the highest levels being obtained in mice of the VP4Δ::VP7 group. This result also correlated with the highest levels of HRV-specific NAb observed in mice of the VP4Δ::VP7 group (Fig. 2.4B). Taken together, the results show that VP4Δ::VP7 fusion protein represents an immunogen of choice for immunization against HRV.

2.4.4 CMI response to HRV

The CMI response to HRV was evaluated in individual mice at day 40 PPI using a rotavirus-specific lymphocyte proliferation test. As shown in Fig. 2.5, the

VP4 and VP4Δ::VP7 groups of mice from experiment 1 showed positive lymphoproliferative response with similar mean SI values of 1.93 (\pm 0.30) and 2.10 (\pm 0.42), respectively. The control GFP and VP7 and VP4Δ groups of mice did not show significant HRV-specific lymphocyte activity.

The VP4Δ::VP7 and VP4/VP7 groups of animals from experiment 2 also showed similar positive lymphocyte response to HRV stimulation. This response was higher than that observed in the VP4Δ/VP7 group.

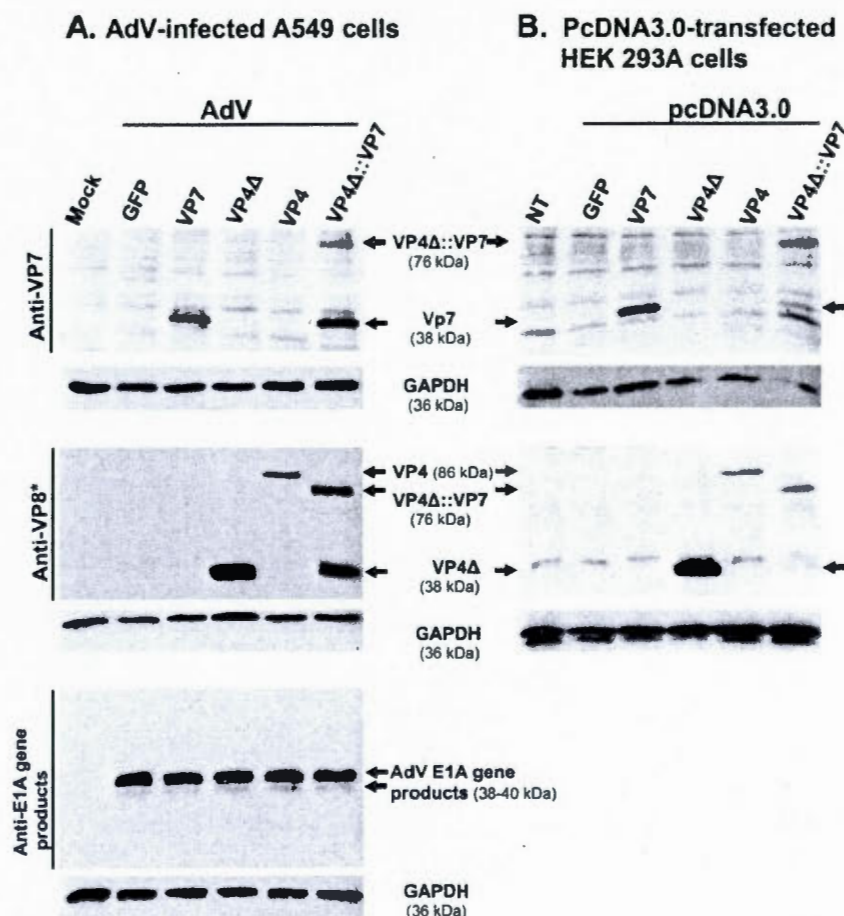


Figure 2.1: Expression in mammalian cells of VP7, VP4, VP4Δ, and VP4Δ::VP7 constructs through replicating but non disseminating adenovector (AdV) or plasmid DNA delivery systems.

Total cell proteins (50 μg) were fractionated on 12% SDS-polyacrylamide gels, electroblotted onto a nitrocellulose membrane and probed with VP7-, VP8*-, or AdV-E1A gene products-specific antibodies. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) immunostaining was used as a loading control. The molecular masses of the expressed proteins are indicated in the central margin. Panel A: Expression of VP7, VP4Δ or AdV E1A proteins were detected by Western blot using total cell protein extracts of A549 cells infected with the various AdVs. Mock-infected or A549 cells infected with an AdV-GFP construct were used as negative controls. Panel B: Expression of VP7 and VP4Δ was detected by Western blot using total cell protein extracts of HEK 293A cells transfected with the various pcDNA3.0 constructs. Non-transfected (NT) HEK 293A cells and cells transfected with pcDNA3.0-GFP were used as negative controls.

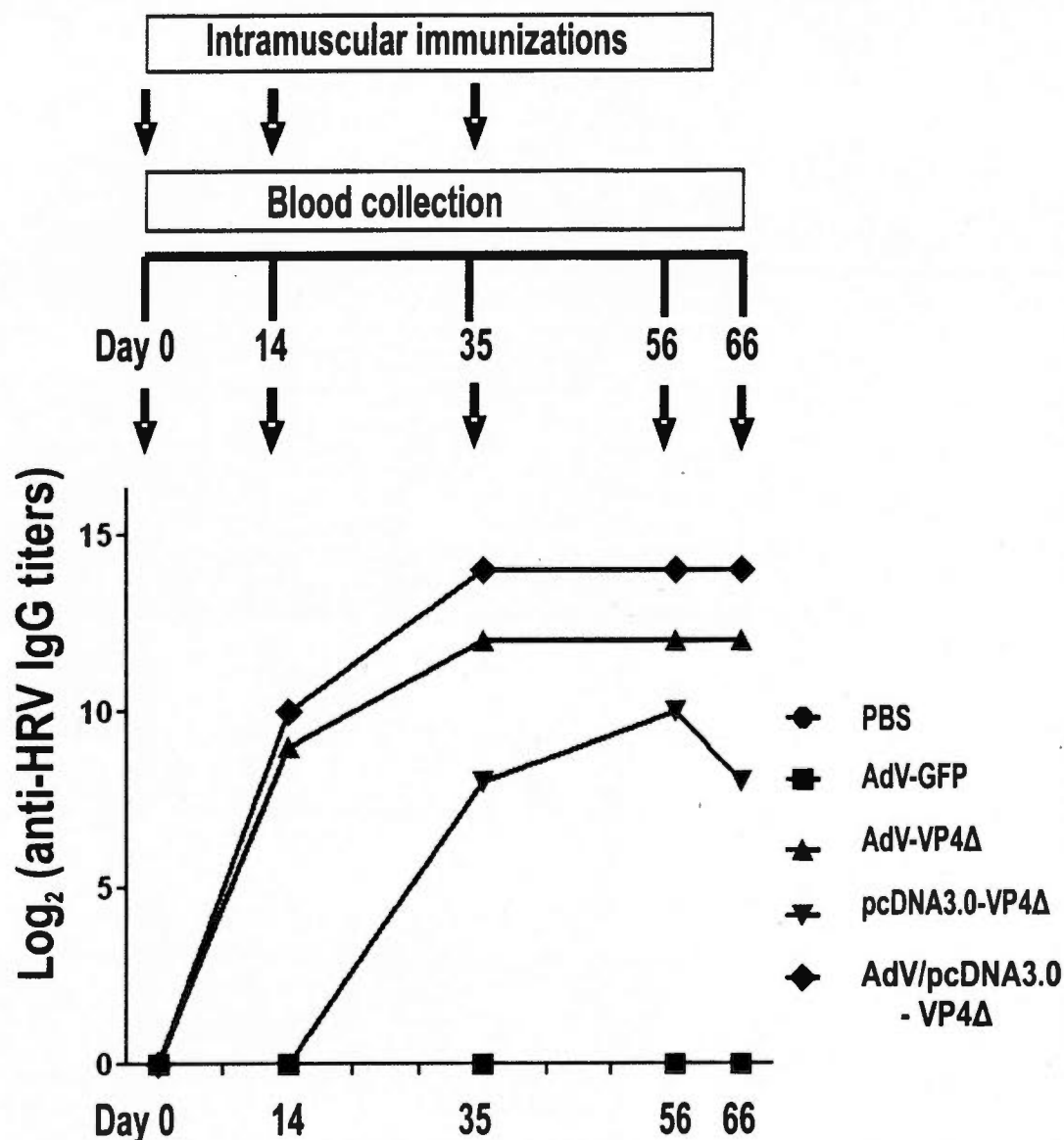


Figure 2.2: Preliminary experiment design and kinetics of anti-HRV IgG antibody production as determined by indirect immunofluorescence assay (IFA). Four groups of five mice received three intramuscular injections on day 0 and on days 14 and 35 post primary immunization (PPI) of (i) PBS, (ii) 1×10^8 TCID₅₀ AdV-GFP, (iii) 1×10^8 TCID₅₀ AdV-VP4Δ, and (iv) 100 μg pcDNA3.0-VP4Δ. A fifth group, namely AdV/pcDNA3.0-VP4Δ, received 1×10^8 TCID₅₀ AdV-VP4Δ on day 0 and 100 μg pcDNA3.0-VP4Δ on days 14 and 35 PPI. Sera were collected on day 0 and on days 14, 35, 56, and 66 PPI. IFA titers of pooled sera from each group of mice were expressed as Log₂ of the reciprocal of the highest serum dilution giving positive fluorescent signal. Titers are representative of three independent tests.

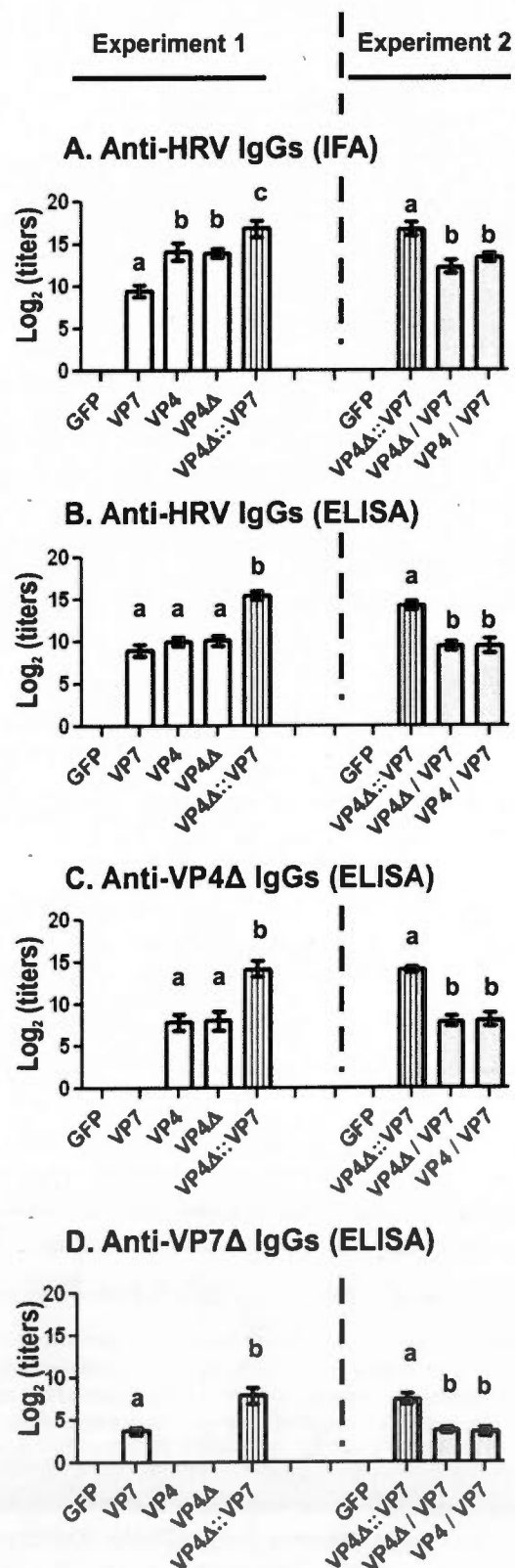
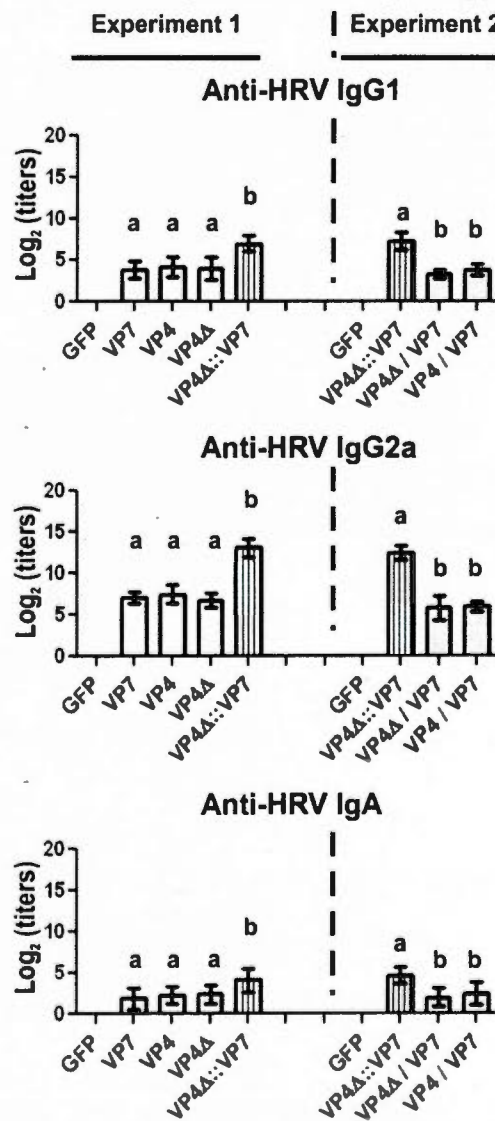


Figure 2.3: Antibody (Ab) response in mice immunized intramuscularly with constructs expressing various HRV immunogens.

In experiment 1, mice were inoculated with 10^8 TCID₅₀ AdVs on day 0 and boosted on days 14 and 35 post primary immunization (PPI) with 100 µg of plasmids expressing the same proteins as for AdVs. The groups of mice were named according to the proteins the animals received: GFP, VP7, VP4, VP4Δ and VP4Δ::VP7. In experiment 2, the first two groups of mice, namely GFP and VP4Δ::VP7, were inoculated with 2×10^8 TCID₅₀ AdVs on day 0 and boosted on days 14 and 35 PPI with 200 µg of recombinant plasmid expressing the same proteins as for AdVs. Mice from two other groups, namely VP4Δ / VP7 and VP4 / VP7, were inoculated on day 0 with a mix of 1×10^8 TCID₅₀ AdV-VP4Δ and 1×10^8 TCID₅₀ AdV-VP7 or with a mix of 1×10^8 TCID₅₀ AdV-VP4 and 1×10^8 TCID₅₀ AdV-VP7, respectively. They were then boosted on days 14 and 35 PPI with a mix of plasmids (100 µg each) expressing the same proteins as AdVs. IFA and ELISA titers of serum samples from each individual mouse were expressed as the Log₂ of the last dilution of sample giving a mean OD higher than two-fold the mean OD obtained from negative control mouse serum. Titers are representative of three independent tests. Labelling of data with superscripts of different letters indicates significant differences at $P < 0.05$ using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test for statistical analyses between multiple groups using GraphPad Prism software (Windows Version 5.0, Graphpad Software, Lajolla, CA, USA).

A. HRV-specific antibody isotypes



B. Serum neutralizing Antibodies

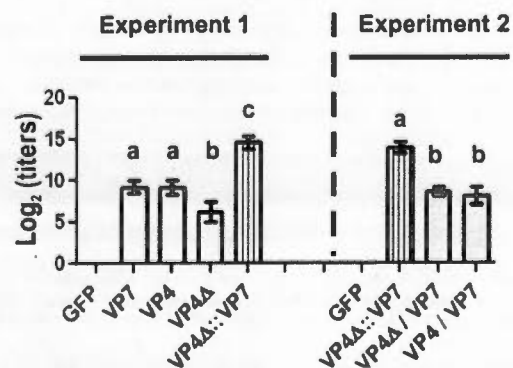


Figure 2.4: Characterization of antibody (Ab) isotypes and neutralizing Ab response specific to HRV on day 40 post primary immunization from the same groups of mice described in the legend of Fig. 2.3.

Panel A: IgA, IgG1 or IgG2a specific to HRV were detected by ELISA using purified HRV particles as antigen. HRP-conjugated goat anti-mouse IgG1 (1:10,000), IgG2a (1:5,000) or IgA (1:5,000) (Santa Cruz Biotechnologies) were added for 1 h at 37°C. Columns represent the mean value of Ab titers (\pm standard deviation). Panel B: Mean (\pm standard deviation) neutralization Ab titers specific to HRV. The neutralization assays were performed in duplicate cell cultures and were repeated twice. Labelling of data with superscripts of different letters indicates significant differences at $P < 0.05$ using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test for statistical analyses between multiple groups using GraphPad Prism software (Windows Version 5.0, Graphpad Software, Lajolla, CA, USA).

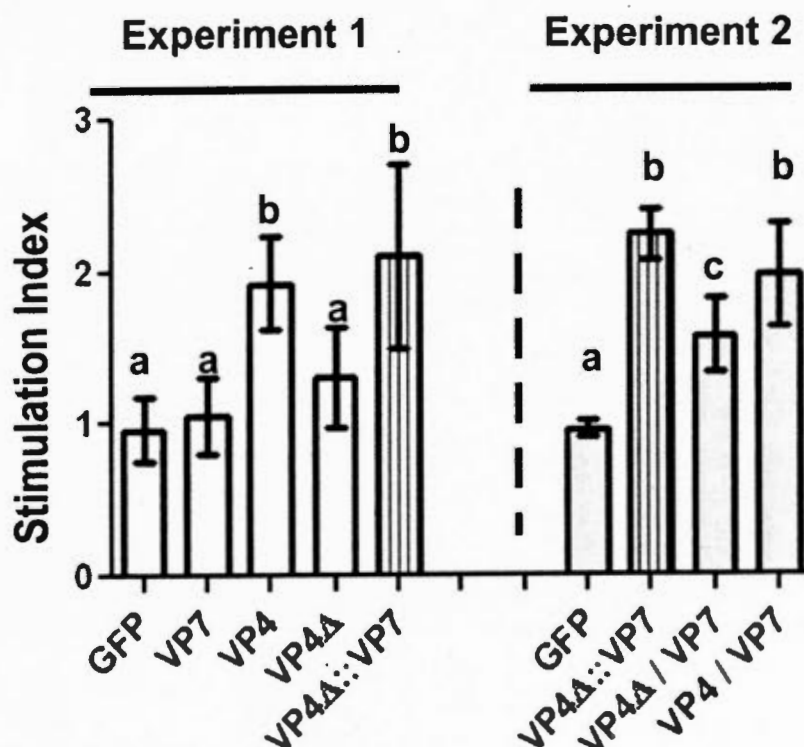


Figure 2.5: HRV-specific lymphoproliferation response from spleen cells of mice on day 40 post primary immunization.

Quadruplicate cell cultures were stimulated with CsCl-purified, UV-inactivated HRV (200 ng/ml) for 72 h. Cells were labelled with radioactive H^3 -thymidine incorporated in DNA for 24 h prior to cell harvesting. Results were expressed as stimulation index (SI) which is the ratio of mean CPM of cells stimulated with the antigen divided by the mean CPM of cells without antigen. Columns represent the mean SI values (\pm standard deviation) obtained in mice of the same groups described in the legend of Fig. 3. Labelling of data with superscripts of different letters indicates significant differences at $P < 0.05$ using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test for statistical analyses between multiple groups using GraphPad Prism software (Windows Version 5.0, Graphpad Software, Lajolla, CA, USA).

2.5 Discussion

In this study, replicating but non disseminating adenovectors were generated and found to be suitable expression vectors for HRV immunogen delivery *in vivo*. The effectiveness of replicating but disseminating adenovectors has been shown in vaccine studies (Peng et al., 2005; Robert-Guroff, 2007). These vectors provide elements of innate immunity and induce immunogen-specific Ab and CMI responses (Liu, 2010; Robert-Guroff, 2007). Another advantage is that AdV genome replication, enabled by the adenovirus E1A genes, increases transgene expression as compared to non replicating AdVs (Bourbeau et al., 2007), a characteristic that is important in vaccinology. Expression of E1A-encoding sequence also offers the advantage of activating the innate immune response through Toll-like receptor (TLR)-dependent and independent pathways, resulting in enhanced type I interferon (IFN) production and, presumably, enhanced vaccine potency (Huarte et al., 2006; Russell, 2009; Zhu et al., 2007). However, safety is a major concern of using these AdVs for vaccination. Here, dissemination was not possible as the replication-competent platform was used with a deletion in the PS gene, preventing the formation of adenovirus infectious particles (Oualikene et al., 2000).

The mature triple-layered icosahedral rotavirus particle has two surface structural proteins termed VP4 and VP7 that determine the P and G genotypes, respectively (Hoshino et Kapikian, 1996). Rotavirus structural VP4 and VP7 proteins are suitable immunogens for vaccine development because they carry the major epitopes eliciting the production of NAbs in the immunized host (Choi et al., 1998; Herrmann et al., 1996; Li et al., 2004; Liu et al., 2005). It is noteworthy that approximately 90% and 65% of HRV strains circulating worldwide share cross-reactive neutralizing epitopes on VP4 and VP7, respectively. In addition, the G1P[8] Wa strain was selected in our study because it was shown that the monovalent Rotarix vaccine which is of the G1P[8] genotype is protective against homotypic,

partially heterotypic, and heterotypic HRV strains (Correia et al., 2010; Fischer Walker et Black, 2011). Nevertheless, as new rotavirus strains may emerge, incorporation of VP4- and VP7-encoding sequences from other viral strains in replicating but non disseminating AdVs may need to be considered for HRV vaccine development. Finally, another way to improve HRV vaccines might be the incorporation of the VP6 protein because of its high degree of conservation among various HRV strains and its ability to induce protection in animal models (Franco et al., 2006; Plotkin, 2010).

Systemic DNA vaccination targeting VP4 and VP7 proteins was shown to correlate with significant production of protective Abs in mice following rotavirus challenge (Herrmann et al., 1996; Herrmann et al., 1999) although failure of this approach to allow protection was also reported (Choi et al., 1998). Non replicating AdVs expressing VP7 or VP4 were also used to immunize monkeys (Li et al., 2004) and mice (Both et al., 1993; Liu et al., 2005), resulting in rotavirus-specific Ab response. Here, vaccination with either a plasmid DNA or an AdV expressing VP4 Δ resulted in HRV-specific Ab responses. Moreover, the AdV-prime/plasmid DNA-boost regimen resulted in VP4 Δ -specific Ab titers that were greater than those obtained from mice immunized with the AdV or plasmid DNA alone (Fig. 2.2).

It is known that non replicating AdVs are capable of either priming or boosting the immune response to an immunogen when used in heterologous immunization regimens (Dunachie et Hill, 2003). Here we demonstrated that replicating but non disseminating AdVs are suitable vectors for priming the Ab response which is currently considered as the best marker of protection against rotavirus (Angel et al., 2012; Franco et al., 2006). The plasmid DNA-prime/vector boost also is a common regimen in vaccinology to achieve protection predominantly mediated by a CD8⁺ T cell response. Such immunization regimen was indeed effective against hepatitis C virus, HIV and malaria (Dunachie et Hill, 2003; Houghton, 2011; Paris et al., 2010).

Since the CMI response has been proposed as a correlate of protection against HRV infection (Franco et al., 2006; Plotkin, 2010), the plasmid DNA-prime/AdV boost immunization regimen might need to be considered for future HRV vaccine development.

By using an AdV-prime/plasmid DNA-boost regimen, we were able to investigate further various HRV immunogens, namely VP7, VP4, VP4 Δ and VP4 Δ ::VP7, in order to determine the best approach to induce optimal HRV-specific immune response. Each of the HRV proteins induced serum HRV-specific IgG and IgA responses capable of neutralizing HRV *in vitro*. Mixed Th1/Th2 responses were also elicited with all immunogens used as shown by the presence of anti-HRV IgG1 and IgG2a isotypes. This aspect of the immune response was not studied when immunizing mice with VP7- or VP4-expressing AdVs (Li et al., 2004; Liu et al., 2005). Our results are thus in agreement with the Th1/Th2 response observed during HRV infection in a pig model (Azevedo et al., 2006) and with the fact that AdVs, like other viral vectors, are able to induce both antibody and CMI responses (Robert-Guroff, 2007).

Fusion of VP4 Δ and VP7 proteins resulted in the highest immune responses in terms of eliciting HRV-specific serum IgGs, IgAs, Nabs and systemic CMI. Although measurement of serum HRV-specific Nabs and IgAs is the current standard for assessing protective immune response following rotavirus vaccination in humans, CMI is also believed to be at play in protection (Franco et al., 2006; Plotkin, 2010). Indeed, VP7 of various rotavirus strains was shown to induce CMI response through CD4⁺/CD8⁺ T cell activation (Buesa et al., 1999; Heath et al., 1997; Jaimes et al., 2005).

This study is the first report using VP4 Δ ::VP7 fusion protein as immunogen to induce a HRV-specific immune response. Other fusion strategies in attempts to

develop a rotavirus vaccine have been investigated. The assembly of several copies of a major rotavirus VP8* epitope was previously shown to improve the immune response (Kovacs-Nolan et al., 2006). Studies in mice also have shown that a fusion between VP8* (the N-terminal subunit of VP4) and a truncated version (first N-terminal 92 aa) of the VP2 protein induces high VP4-specific Ab titers (Istrate et al., 2008). Remarkably, the VP4 Δ ::VP7 fusion protein generated an Ab immune response that was higher than that obtained with VP4 or VP7 alone, or with a mix of both latter proteins, suggesting a synergetic effect for VP4 Δ ::VP7. Such immune synergetic effect in using fusion proteins was also observed in the influenza virus (Wei et al., 2011) or *Plasmodium falciparum* (Theisen et al., 2004) systems.

Induction of mucosal immunity in the intestine in terms of secretory IgA response is crucial in preventing or clearing rotavirus infection (Franco et al., 2006). Nevertheless, high serum IgG and/or IgA levels have been associated with protection against HRV infections in some studies (Franco et al., 2006; Plotkin, 2010). Here we determined for the first time that replicating but non disseminating AdVs used either alone or in combination with plasmid DNA in a prime-boost strategy are suitable vectors for immunogen delivery. We also showed that both the Ab and CMI responses to rotavirus were induced when using these vectors. This work lays the foundation for developing subunit vaccines against rotavirus infection, targeting more particularly the VP4 Δ ::VP7 fusion protein, and to use the replicating but non disseminating adenovector system for mucosal administration to induce protective local immunity. Additional work is needed to determine the efficacy of this vaccine strategy in a rotavirus infection model.

2.6 Acknowledgements

A. Girard was supported by a graduate studentship from La Fondation UQAM. E. Roques received support from graduate studentships from FARE (Fond de l'Accessibilité à la Réussite des Étudiants, University of Québec at Montréal) and CRIP (Centre de Recherche en Infectiologie Porcine, University of Montreal). This work was supported by research grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Canadian Institutes of Health Research (NSER/CIHR CHRP program) to Denis Archambault and Bernard Massie. We thank Dr. Peter Lee for his help in editing the manuscript and Dr. Andrea Gomez Corredor for helpful discussion. We also thank Denis Flipo for technical assistance with fluorescence microscopy.

CHAPITRE III

FLAGELLIN IN FUSION WITH HUMAN ROTAVIRUS
STRUCTURAL PROTEINS EXERTS AN ADJUVANT EFFECT
WHEN DELIVERED WITH REPLICATING BUT NON
DISSEMINATING ADENOVECTORS THROUGH THE
INTRARECTAL ROUTE

Aurélie Girard^a, Élodie Roques^a, Bernard Massie^{b,c}, and Denis Archambault^{a,*}.

Affiliations: ^a University of Québec at Montréal, Department of Biological Sciences,
P.O. Box 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

^b Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100
Royalmount Avenue, Montréal, Québec, H4P 2R2, Canada.

^c University of Montreal, Department of Microbiology and Immunology, CP 6128
Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada.

Ce chapitre est présenté sous forme d'article scientifique et a été accepté pour publication dans la revue *Molecular Biotechnology*. La conception, réalisation et l'analyse des expériences ont été faites par l'auteur de cette thèse. La rédaction du manuscrit ainsi que le montage des figures ont été réalisés par l'auteur de cette thèse. Élodie Roques a été impliquée dans les essais de lymphoprolifération. Le Docteur Bernard Massie a développé le système d'adénovirus recombinants. Le Docteur Denis Archambault a participé à la conception des expériences, a supervisé le projet et corrigé le manuscrit. Tous les auteurs ont discuté des résultats, révisé et approuvé le manuscrit final.

3.1 Abstract

The aim of this study was to determine whether flagellin in fusion with human rotavirus (HRV) structural proteins stimulates the innate immune response and enhances the HRV-specific immune response when delivered through the intrarectal route with replicating but non disseminating adenovector (R-AdV). *Salmonella typhimurium* flagellin B (FljB) in fusion with HRV VP4 Δ ::VP7 protein induced IL-1 β production in J774A.1 macrophages exposed to the R-AdV. Intrarectal administration of R-AdVs expressing either VP4 Δ ::VP7 or VP4 Δ ::VP7::FljB in BALB/c mice resulted in HRV-specific mixed Th1/Th2 immune responses. The HRV-specific antibody response elicited with the use of R-AdV expressing VP4 Δ ::VP7::FljB was higher than that with R-AdV expressing VP4 Δ ::VP7. The results also show that the replication capability of R-AdVs contributed to enhance the HRV-specific immune response as compared with that obtained with non-replicative AdVs. This work lays the foundation for using the R-AdV system and FljB-adjuvanted formulation to elicit a mucosal immune response specific to HRV.

Keywords: rotavirus, replicating but non disseminating adenovectors, flagellin, adjuvant, fusion protein.

3.2 Introduction

Unlike live-attenuated vaccines, most killed pathogen- and subunit-based vaccines are inefficient at inducing optimal immune responses (Mishra et al., 2010; Silin et al., 2007). As a result, these vaccines generally require the use of adjuvants to modulate and/or enhance the immune response to the administered immunogens (Reed et al., 2009). Adjuvants are either vehicles that optimize immunogen delivery and presentation to the immune system (Reed et al., 2009; Sun et al., 2009) or immunomodulating agents, such as cytokines and Toll-like receptor (TLR) ligands that activate the innate immune system (Reed et al., 2009). While vehicle-type (for instance Alum and Squalene MF-59TM) or immunomodulating [for instance 3-*O*-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A, (MLP)] adjuvants are extensively used in human vaccine formulations for systemic vaccination (Garcon et al., 2011; Gosselin et al., 2009; Plotkin, 2009; Reed et al., 2009; Silin et al., 2007), there are no commercially available adjuvants for use in mucosal immunization (Silin et al., 2007). Therefore, development of novel adjuvants and delivery strategies is necessary in order to improve the efficacy of mucosal immunization (Belyakov et Ahlers, 2009).

Previous studies have shown the potency of flagellin as both a systemic and mucosal adjuvant when either mixed or fused to an immunogen (Bates et al., 2011; Delaney et al., 2010; Girard et al., 2011; Lee et al., 2006; Pino et al., 2005; Salman et al., 2009; Sarti et al., 2011; Takata et al., 2006; Taylor et al., 2011; Yamamoto et al., 2010). Flagellin, a structural protein of the flagellar filament of Gram-negative and of a few Gram-positive bacteria possesses highly conserved domains across bacterial species (Yonekura et al., 2005). Consistently, an adjuvant effect has been described in flagellins derived from *Salmonella typhimurium* (FljB or FliC) (Bates et al., 2011; Delaney et al., 2010; Girard et al., 2011; Pino et al., 2005; Salman et al., 2009; Sarti

et al., 2011; Takata et al., 2006; Taylor et al., 2011; Yamamoto et al., 2010), *Legionella pneumophila* (FlaA) (Xu et al., 2011), *Listeria monocytogenes* (FlaA) (Schulke et al., 2011) and *Vibrio vulnificus* (FlaB) (Lee et al., 2006).

Flagellin exerts its adjuvant effect by activating the innate immune system through binding to TLR5 expressed at the surface of a variety of cells including dendritic cells, macrophages and enterocytes (Miao et al., 2007). The flagellin-TLR5 binding initiates an immune cascade through intracellular signaling which results in translocation of the NF- κ B transcription factor to the nucleus and then activation of genes encoding pro-inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6), IL-8 and/or tumor-necrosis-factor- α (TNF- α), (Gewirtz et al., 2001a; Rhee et al., 2004). Flagellin can also bind the ICE protease-activating factor (IPAF; also known as CARD12 or NLRC4), a member of the intracellular Nod-like receptor (NLR) family (Miao et al., 2007). In macrophages, binding of flagellin to IPAF induces caspase-1 cleavage leading to secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 (Lightfield et al., 2008; Miao et al., 2007). To date, flagellin's adjuvant property when delivered intracellularly has been demonstrated in only two studies where plasmid DNA (Applequist et al., 2005) or recombinant vesicular stomatitis virus (VSV) (Ahmed et al., 2010) were used as vaccine vectors.

Human rotavirus (HRV) is recognized as being one of the most important infectious agents causing severe dehydrating diarrhea in infants and young children (Soares-Weiser et al., 2010). It has been estimated that rotavirus infection is responsible for about 500,000 deaths annually, mostly in developing countries (Chen et al., 2012b). Although a viremic state may occur, HRV is primarily found in the intestinal tract due to infection of enterocytes in the small intestine (Blutt et al., 2003). The mature, triple-layered icosahedral virus particle has two surface structural proteins, termed VP4 and VP7, which have been selected by many investigators to serve as candidate immunogens for the development of subunit vaccines against HRV

(Choi et al., 1998; Qiao et al., 2009; Wigdorovitz et al., 2004). These proteins are involved in HRV cell binding and entry (Pesavento et al., 2006) and contain the major epitopes for the induction of neutralizing antibodies (NAbs) in a virus-exposed host (Franco et al., 2006). These Nabs account for viral clearance although the cell-mediated immune (CMI) response may also play a role in eliminating the virus (Franco et al., 2006; Plotkin, 2010).

In a recent study, we reported on the potential use of replicating but non disseminating adenovector (R-AdV) encoding VP4 Δ (amino acids 1–336 of VP4 containing NAb-inducing epitopes) in fusion with VP7 (termed VP4 Δ ::VP7) to serve as a subunit vaccine (Girard et al., 2013). This AdV is based on a replication-competent platform consisting of a human adenovirus type 5 genome with a deletion in the protease (PS) gene (Oualikene et al., 2000), the product of which is necessary for viral assembly (Russell, 2009). In the absence of the PS gene, the AdV replicates its DNA normally in infected cells but fails to form infectious particles, thus preventing its dissemination within the host environment (Oualikene et al., 2000; Russell, 2009).

In this study, we report for the first time the adjuvant effect of *S. typhimurium* flagellin (FljB) when fused to VP4 Δ ::VP7 and delivered by R-AdV through the intrarectal route in BALB/c mice. The results showed that this vaccine strategy induced a HRV-specific antibody (Ab) response both systemically and locally in the small intestine. We also show that the replicative property of the R-AdV was essential to induce mucosal immunity in the intestine.

3.3 Material and methods

3.3.1 Cell cultures

The human alveolar adenocarcinoma A549 and embryonic kidney 293 A (HEK 293A) cell lines and simian epithelial kidney MA104 cells were maintained in Dulbecco minimal essential medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, PAA Laboratories, Etobicoke, ON, Canada). The 293-PS-CymR cell line, a clone derived from the HEK 293A cells, was propagated as previously described (Mullick et al., 2006; Oualikene et al., 2000). J774A.1 macrophage-like cells (TIB-67, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were maintained in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10 % FBS. All cell lines were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

3.3.2 Recombinant adenoviruses

R-AdVs expressing GFP or VP4Δ::VP7 of the HRV Wa strain have been described (Girard et al., 2013). *Salmonella enterica* serovar typhimurium SL1344 strain FljB- (GenBank accession no. NC016810.1) encoding gene was optimized for codon usage like the VP4Δ::VP7 encoding sequence to ensure optimal expression in mammalian cells, and was synthesized through commercial services (GeneArt, Regensburg, Germany). FljB- and VP4Δ::VP7-FljB-encoding sequences were first subcloned into the *Bgl II* restriction site of the modified shuttle vector pAdenoVator-CMV5(CuO)-IRES-E1A (Girard et al., 2013; Roques et al., 2013). The various R-AdVs (AdVΔPS-CuO-transgene-IRES-E1A) were generated as described (Girard et al., 2013) using the AdEasy system (MP Biomedicals) and the AdVΔPS backbone according to the manufacturer's protocol. Replicative-defective adenovectors (RD-AdVs) encoding VP4Δ::VP7-FljB were generated using the AdEasy system (MP

Biomedicals) consisting of the shuttle vector pAdenoVator-CMV5-IRES-GFP and an adenovirus genomic backbone containing a functional PS-encoding gene.

R-AdVs and RD-AdVs were propagated in the 293-PS-CymR complementing cell line and in HEK 293A cells, respectively. Both types of AdV were produced at high titers and purified by double cesium chloride (CsCl) gradient (Bourbeau et al., 2007).

3.3.3 Protein expression

Protein expression from the generated AdV was monitored in A549 cells that were plated in six-well plates at a density of 5×10^5 cells per well and transduced with each recombinant AdV at various multiplicities of infection (MOI). After an incubation time of 48 h, whole cell protein extracts were prepared (Gomez Corredor et Archambault, 2009) and stored at -80°C until further use. FljB expression was monitored in J774A.1 cells transduced with each R-AdV and RD-AdV at an MOI of 250. After 24 h of incubation, whole cell protein extracts were prepared as above.

For each sample, 50 μg of whole cell protein extracts were electrophoretically separated onto 12% sodium-dodecyl-sulfate (SDS)-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were saturated overnight at room temperature with a phosphate buffered salt solution (pH 7.3) (PBS) containing Tween 20 (0.05 % v/v) (PBS-T) and 5% (w/v) powdered skimmed milk. Membranes were then exposed for 1 h to a 1:10,000 dilution in PBS-T of either rabbit anti-FljB polyclonal Abs (Girard et al., 2011), mouse anti-E1A monoclonal Abs (Millipore, Billerica, MA, USA) or mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) monoclonal Abs (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Horse-radish peroxidase (HRP)-coupled goat anti-rabbit-IgG (1:10,000) or HRP-coupled goat anti-mouse-IgG (1:10,000) (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) added for 1 h at room temperature served as secondary Abs. The signal

was detected by enhanced chemiluminescence (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) as described (Girard et al., 2013).

To determine the immunomodulatory effect of FljB expression in transduced J774A.1 cells, culture supernatants were harvested for IL-1 β production as measured by ELISA using the BD OptEIATM mouse set (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). The experiment was repeated three times.

3.3.4 Rotavirus production

The human rotavirus (HRV) Wa strain was propagated in MA104 cells as described (Gray et Desselberger, 2000). The virus was purified using CsCl gradients (Gray et Desselberger, 2000) and titered using a focus fluorescent unit assay (FFU) (Coulson et Masendycz, 1990). Virus concentration was calculated using the equation $OD_{260} \times \text{dilution factor} \times 185 \mu\text{g/ml}$ (Gray et Desselberger, 2000).

3.3.5 In vivo studies in mice

Six-week-old female BALB/c mice were purchased from Charles River (St-Constant, QC, Canada). All experiments in mice were approved by the University of Québec at Montréal's Institutional Animal Protection Committee, in accordance with the rules and regulations of the Canadian Council for Animal Care.

3.3.5.1 Intrarectal administration

Mice were fasted for 8 h prior to the intrarectal administration of 100 μl per dose per animal. The procedure was carried out under anaesthesia with isoflurane (Fisher Scientific, Ville St-Laurent, QC, Canada) using a polyethylene catheter (PE20) introduced up to a distance of 4 cm from the anus. Animals remained in a supine position for 2 min with the head facing upwards (at a 45° angle) in order to achieve optimal distribution of the inoculum in the administration site and to impede

its immediate return. The sedated animals were thereafter placed in their cages with free access to water and food.

3.3.5.2 Intrarectal immunization of mice with AdVs and sample collection

Four groups of eight mice were treated with the respective AdV (1×10^8 TCID₅₀ per dose) on day 0 and on day 21 post-primary immunization (PPI) through the intrarectal route. The control group received R-AdV expressing GFP. Mice of the second and third groups were immunized with R-AdV expressing either VP4Δ::VP7 or VP4Δ::VP7::FljB, respectively. Mice of a fourth group received RD-AdV encoding VP4Δ::VP7::FljB. Mice were euthanized on day 42 PPI. Mice were anesthetized with isoflurane, and blood was collected from each of the mice by cardiac puncture. Following clotting, samples were centrifuged ($600 \times g$ at room temperature for 10 min) and the resulting sera were stored at -20°C until further analysis for HRV-specific Ab determination.

Small intestines were removed and washed with 5 ml of cold washing buffer (PBS, 25 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma-Aldrich), 1% bovine serum albumin (BSA, Fisher Scientific) and complete protease inhibitor cocktail (Roche, Laval, QC, Canada)) (Girard et al., 2011). Intestinal contents were centrifuged ($3,500 \times g$) at 4°C for 15 min and the collected supernatant fluids were stored at -80°C until HRV-specific Ab determinations could be made.

For analysis of the HRV-specific lymphoproliferative response used as a correlate of CMI, spleens were collected aseptically and their mononuclear cell content isolated using standard methods (Girard et al., 2013).

3.3.6 Indirect ELISA

The presence of anti-FljB or anti-HRV Abs in mouse serum or intestinal washes was determined by an indirect ELISA. Wells of 96-well ELISA plates (Fisher Scientific) were each coated with $1 \mu\text{g}$ recombinant FljB produced in bacteria

(Bergeron-Sandoval et al., 2011) or with 1 ng UV-inactivated (Caballero et al., 2004) CsCl-purified HRV, each diluted in 100 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) to a final volume of 100 μ l. Following overnight incubation at 4 °C, plates were washed four times with PBS-T and blocked with 150 μ l of PBS-T containing 1% (w/v) BSA (PSB-T-BSA) for 1 h at 37°C. Serum or intestinal wash samples diluted 1:100 or 1:2, respectively, were added into wells (100 μ l per well, two wells per dilution) and incubated for 2 h at 37°C. Plates were washed as described above and the presence of bound Abs was detected using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (HRP-IgG) diluted 1:20,000 in PBS-T-BSA or HRP-conjugated goat anti-mouse IgG1 (1:10,000), IgG2a (1:5,000) or IgA (1:5,000) (Santa Cruz Biotechnologies). The presence of HRP-coupled secondary Abs was detected by adding 100 μ l 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB, Sigma-Aldrich) per well. Reaction development was stopped after 30 min by adding 50 μ l of 1M H₂SO₄. Optical density (OD) was determined at 450 nm using a Tecan Infinite M1000 multi-well plate reader (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland). The assay was repeated three times in independent tests for each animal in each of the groups.

3.3.7 Rotavirus neutralization assay

The presence of rotavirus-specific NAbs in mouse sera was determined using a modification of the method described by Coulson and Masendycz (Coulson et Masendycz, 1990; Kovacs-Nolan et Mine, 2006). Briefly, sera were inactivated at 56°C for 30 min before testing. Serial two-fold dilutions in DMEM (starting at 1:8) of each serum sample were mixed with an equal volume of the rotavirus supplemented with 5 μ g/ ml of porcine pancreatic trypsin, followed by an incubation at 37°C for 1 h. The serum-virus mixture (25 μ l per well containing 250 FFU of virus) was then used to inoculate duplicate cultures of MA104 cells in 96-well tissue culture plates for 96 h. For each well, cytopathic effect was evaluated and compared to MA104 cells inoculated with the virus and treated with control serum of mice immunized with

GFP. NAb titers were expressed as the \log_2 of the reciprocal of the last serum dilution with no cytopathic effect. The neutralization assays were repeated twice.

3.3.8 Spleen lymphocyte proliferation assay

The spleen lymphocyte proliferation assay was performed as previously described (Girard et al., 2013). Briefly, quadruplicate cell cultures plated in 96-well plates were treated with either UV-inactivated purified rotavirus (200 ng/ml), FljB (1 μ g/ml), Concanavalin A (Con A, Sigma-Aldrich) (1.5 μ g/ml) used as a control of lymphocyte functional activity, or cell culture medium (control cell cultures). The cells were incubated for a total of 72 h at 37°C. Cells were pulsed with 0.5 μ Ci of tritiated thymidine (specific activity, 6.7 Ci/mmol; Perkin Elmer, Woodbridge, ON, Canada) for 24 h prior to harvesting on a Wallac silica membrane (Perkin Elmer). The bound radioactivity was measured using the Wallac Microbeta 1450 Trilux liquid scintillation counter (Perkin Elmer). The lymphoproliferative response was expressed by calculating the stimulation index (SI) which represents the ratio of the mean counts per minute (CPM) incorporated by the antigen-containing cell cultures to the mean CPM incorporated by the control cell cultures.

3.3.9 Analysis of colonic innate immunity in intrarectally inoculated mice

Mice were subdivided into seven groups of six mice and were inoculated intrarectally on day 0. Mice of the first group were given PBS alone and served as negative control animals. Four other groups received 1×10^8 TCID₅₀ of R-AdVs encoding either GFP-, FljB-, VP4 Δ ::VP7- or VP4 Δ ::VP7::FljB. Mice of the sixth group received 1×10^8 TCID₅₀ of RD-AdV encoding VP4 Δ ::VP7::FljB. Mice of the seventh group were treated with 25 mg/ml 2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS, Sigma Aldrich) diluted in 40% ethanol (vol/vol) to a final volume of 100 μ l.

Animals were weighed and monitored daily for the presence of clinical signs of piloerection, immobility, diarrhea and/or rectal bleeding. Mice were euthanized 48

h after treatment. Colons were removed and washed with 5 ml of the cold washing buffer described above. Colons were taken for homogenization in 1 ml of lysis buffer (PBS, 25 mM EDTA and complete protease inhibitor cocktail). Homogenates were centrifuged ($3,500 \times g$) at 4°C for 15 min and supernatants were stored at -80°C . IL-1 β concentration was measured as above.

3.3.10 Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test were carried out for statistical comparisons between multiple groups using GraphPad Prism software (Windows Version 5.0, Graphpad Software, Lajolla, CA, USA). Significance was set at $P < 0.05$.

3.4 Results

3.4.1 Protein expression from adenovectors

Sequences encoding FljB and VP4 Δ ::VP7::FljB were inserted each into the R-AdV genome. Similarly, sequences coding for GFP and VP4 Δ ::VP7::FljB were inserted each into the RD-AdV genome. Expression of HRV proteins by Western blot (WB) using either anti-VP4 or anti-VP7 Abs were observed in A549 cells infected with the VP4 Δ ::VP7- (Girard et al., 2013) and VP4 Δ ::VP7::FljB-expressing AdV used at an MOI of 100. Molecular weights (MW) of the expressed proteins were as predicted for the corresponding genes (data not shown).

The WB procedure was also carried out using FljB-specific rabbit antiserum. As shown in Fig. 3.1A, positive expression signals were obtained from J774A.1 macrophages infected with FljB- (lane 3) or VP4 Δ ::VP7::FljB- (lane 5) expressing R-AdVs used at an MOI of 250. No signal was observed from cells infected with either GFP- or VP4 Δ ::VP7-expressing R-AdV (lanes 2 and 4, respectively). As expected, the 38 kDa and 40 kDa E1A gene products that allow adenovirus DNA replication in infected cells (Bourbeau et al., 2007) were detected in the cellular extracts of R-AdV-infected J774A.1 cells for each construct (Fig. 3.1A, lanes 2-5). When the assay was performed in macrophage cells infected with the VP4 Δ ::VP7::FljB-expressing RD-AdV used at MOIs of either 250 or 1000, a positive FljB signal was observed only with the latter MOI (Fig. 3.1A, lane 7). Similar discrepancy in expression levels of VP4 Δ ::VP7::FljB from RD-AdVs used at various MOIs was also observed in A549 cells (Fig. 3.1B, lanes 6-9).

3.4.2 FljB and VP4Δ::VP7::FljB expressed in J774A.1 macrophages induces IL-1β secretion

To determine a possible activation of the innate immune system by FljB expressed intracellularly, IL-1β production was monitored in supernatant fluids of J774A.1 cells infected for 24 h with either R-AdVs (expressing GFP, FljB, VP4Δ::VP7 and VP4Δ::VP7::FljB), or RD-AdVs (expressing GFP and VP4Δ::VP7::FljB). As shown in Fig. 3.1C, expression of GFP or VP4Δ::VP7 from R-AdVs correlated with low and comparable levels of IL-1β. RD-AdV expressing GFP did not induce the production of detectable IL-1β. In contrast, expression of FljB used either alone or as a fusion protein with VP4Δ and VP7 induced high IL-1β production by J774A.1 macrophages using either R-AdV or RD-AdV as delivery systems. However the FljB fusion to HRV proteins in the R-AdV system resulted in a lower IL-1β level of secretion when compared to FljB alone. Despite differences in VP4Δ::VP7::FljB protein expression due to the AdV system employed (Fig. 3.1B), levels of secreted IL-1β by macrophages transduced with either of the AdV types were nearly comparable although they were statistically different. Increasing the RD-AdV MOI from 250 to 1000 did not enhance the IL-1β level in transduced macrophages.

3.4.3 FljB fusion with VP4Δ::VP7 enhances antibody (Ab) response to HRV when using R-AdV inoculated through the intrarectal route

HRV-specific Ab responses were investigated by indirect ELISA (using CsCl-purified, UV-inactivated HRV as substrate antigen) in sera and intestinal washes collected on day 42 PPI from individual BALB/c mice intrarectally immunized with R-AdV-delivered antigens (namely GFP, VP4Δ::VP7 or VP4Δ::VP7::FljB) (Fig. 3.2 and 3.3). Mice receiving R-AdV expressing VP4Δ::VP7 through the intrarectal route mounted both systemic (serum) and mucosal (intestine) Ab responses (Fig. 3.2 and 3.3). The use of R-AdV expressing VP4Δ::VP7::FljB significantly increased the

HRV-specific Ab responses in terms of serum IgG (Fig. 3.2A), serum IgA (Fig. 3.2B) and intestinal IgA (Fig. 3.3) levels when compared to those obtained with the use of R-AdV expressing VP4 Δ ::VP7. These results correlated with the levels of HRV NAbs in sera from mice of both groups (Fig. 3.2E).

HRV-specific serum Abs were further analysed by IgG isotyping. High levels of HRV-specific IgG1 and IgG2a were detected in mice immunized with R-AdV expressing VP4 Δ ::VP7 or VP4 Δ ::VP7::FljB when compared to animals receiving GFP as control antigen (Fig. 3.2C and D). Although no differences between both animal groups were observed in anti-HRV IgG1 production, the addition of FljB to the HRV immunogens increased the level of anti-HRV IgG2a (Fig. 3.2D).

Although the FljB fusion to VP4 Δ ::VP7 increased the HRV-specific Ab response, it did not impact the HRV-specific spleen lymphoproliferative response (Fig. 3.4). The R-AdV-VP4 Δ ::VP7- and R-AdV-VP4 Δ ::VP7::FljB-treated groups of mice showed low and similar lymphocyte response to HRV stimulation with respective mean SI values of 1.55 (\pm 0.2) and 1.73 (\pm 0.2), whereas the control group of mice given R-AdV GFP showed no HRV-specific lymphocyte activity at all. Mice of all groups of mice showed robust spleen lymphocyte polyclonal activation to Con A stimulation (data not shown).

3.4.4 Replicating but non disseminating AdV (R-AdV) is more efficient than replication-defective AdV (RD-AdV) in inducing an immune response specific to VP4 Δ ::VP7::FljB

In addition to the group of mice intrarectally immunized with R-AdV expressing VP4 Δ ::VP7::FljB, mice of an additional group were treated with the same dose of RD-AdV also expressing VP4 Δ ::VP7::FljB. Higher serum HRV-specific total IgG (Fig. 3.2A), IgG2a (Fig. 3.2D) and NAb (Fig. 3.2E) levels were obtained in mice

immunized with the R-AdVs when compared to those obtained with RD-AdVs. The RD-AdV system did not significantly induce the production of anti-HRV IgG1 (Fig. 3.2C) and IgA in serum (Fig. 3.2B) or IgA in the intestinal washes (Fig. 3.3) when compared to the R-AdV system, nor did it induce detectable HRV-specific spleen lymphoproliferative response in immunized mice (Fig. 3.4).

3.4.5 Adenovectors expressing VP4Δ::VP7::FljB induce immune responses specific to FljB

VP4Δ::VP7::FljB either delivered with R-AdV or RD-AdV induced the production of anti-FljB IgG in sera from intrarectally immunized mice (Fig. 3.5A). The highest Ab levels were obtained using the R-AdV system. Although significant levels of FljB-specific serum and intestinal IgA were detected in mice immunized with R-AdV, no FljB-specific IgAs were detected in mice which received RD-AdV (Fig 3.5A).

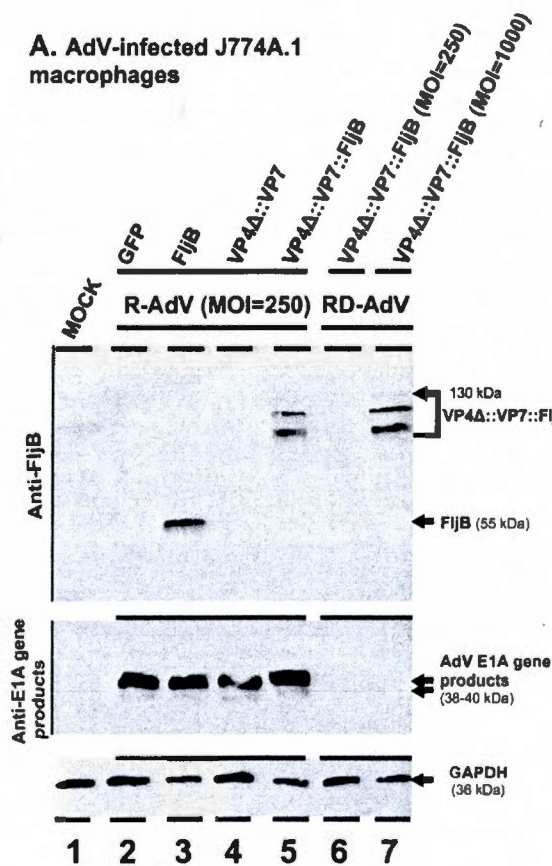
The lymphoproliferative response to FljB was also evaluated in splenic leukocytes collected from individual mice. As shown in Fig. 3.5B, mice of the R-AdV-VP4Δ::VP7::FljB-treated group developed a significant lymphocyte response to FljB stimulation with a mean SI of 3.76 ± 1.67 . In contrast, mice of the RD-AdV-VP4Δ::VP7::FljB-treated group did not show FljB-specific lymphocyte activity with a mean SI of $2.04 (\pm 0.26)$ that was comparable to the mean SI of $1.7 (\pm 0.19)$ observed in mice of the control group treated with R-AdV-GFP.

3.4.6 FljB and VP4Δ::VP7::FljB delivered intrarectally by adenovectors do not induce colonic inflammatory cytokine production

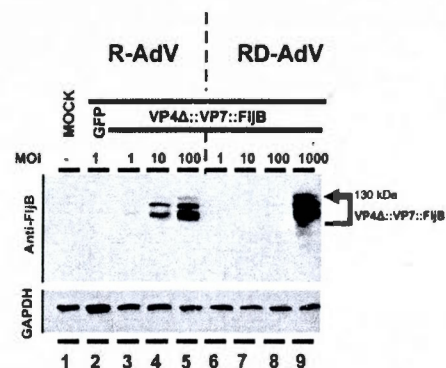
During the immunization procedure, a few mice receiving R-AdV or RD-AdV expressing VP4Δ::VP7::FljB developed overt signs of piloerection and immobility from 24 to 72 h following intrarectal administration, suggesting an inflammatory state

(Ruyssers et al., 2009). Since the infection of J774A.1 cells with either R-AdV or RD-AdV was found to induce the secretion of IL-1 β in vitro (Fig. 3.1C), we asked whether FljB expression might be responsible for the observed signs of inflammation. Accordingly, mice were inoculated intrarectally with R-AdV expressing GFP, FljB, VP4 Δ ::VP7, VP4 Δ ::VP7::FljB or RD-AdV expressing VP4 Δ ::VP7::FljB. Mice of two other groups received PBS (negative control) or TNBS, a known pro-inflammatory agent used as a positive control of inflammation (Bai et al., 2010), respectively. As expected, the TNBS treatment resulted in a significant reduction in body weight (Fig. 3.6A). Moreover, all mice receiving TNBS showed external signs of piloerection and immobility from 6 h following treatment in comparison to a fraction of animals from groups receiving FljB. These clinical observations are consistent with the results obtained from the analysis of colonic tissue homogenates 48 h following treatment that showed enhanced production of IL-1 β (Fig. 3.6B), IL-6 and TNF- α (data not shown) in mice of the TNBS-treated group when compared to all the other groups of mice. Mice of the latter groups showed comparable quantities of IL-1 β , although a significant increase was observed in mice of the R-AdV-VP4 Δ ::VP7::FljB group when compared to that seen in mice receiving either PBS or the VP4 Δ ::VP7::FljB-expressing RD-AdV.

A. AdV-infected J774A.1 macrophages



B. AdV-infected A549 cells



C. IL-1 β secretion in J774A.1 macrophages

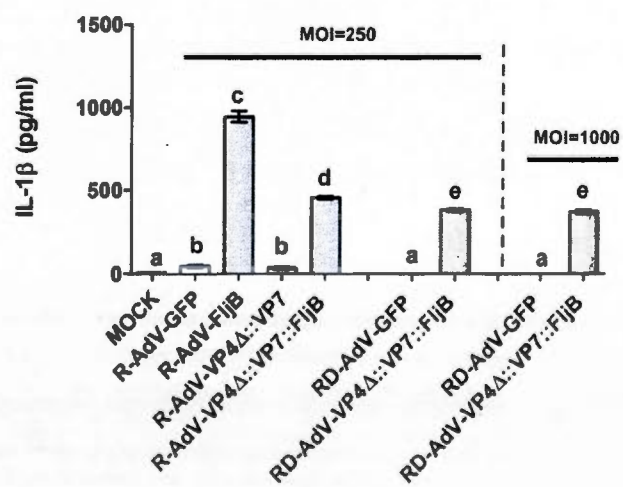


Figure 3.1 Expression of FljB constructs in mammalian cells through replicating but non disseminating AdV (R-AdV) or replicative-defective AdV (RD-AdV) delivery systems.

Total cell proteins (50 μ g) were separated on 15% SDS-polyacrylamide gels, electroblotted onto a nitrocellulose membrane, and probed with FljB-specific, or adenovirus E1A gene products-specific antibodies. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) immunostaining was used as a loading control. The molecular masses of the expressed proteins are indicated in the central margin. Panel A: Expression of FljB or adenovirus type 5 E1A gene products were detected by western blot assays with total cell protein extracts of J774A.1 cells infected with AdV encoding the appropriate constructs. Mock infected or J774A.1 cells (lane 1) infected with R-Ad-GFP construct (lane 2) were used as control. Panel B: Expression of VP4 Δ ::VP7::FljB was detected by western blot assays with protein extracts of A549 cells transduced with R-AdV or RD-AdV at different MOI during 48 h. Non-infected cells (MOCK) and cells transduced with R-AdV-GFP were used as negative control. Panel C: Production of IL-1 β inflammatory cytokine was quantified by ELISA in J774A.1 macrophage culture supernatant fluids harvested after 24 h of infection with the different R-AdV or RD-AdV. Columns represent the mean value of IL-1 β concentrations of three independent experiments (\pm standard deviation). Labelling of data with superscripts of different letters indicates significant differences between groups at $P < 0.05$.

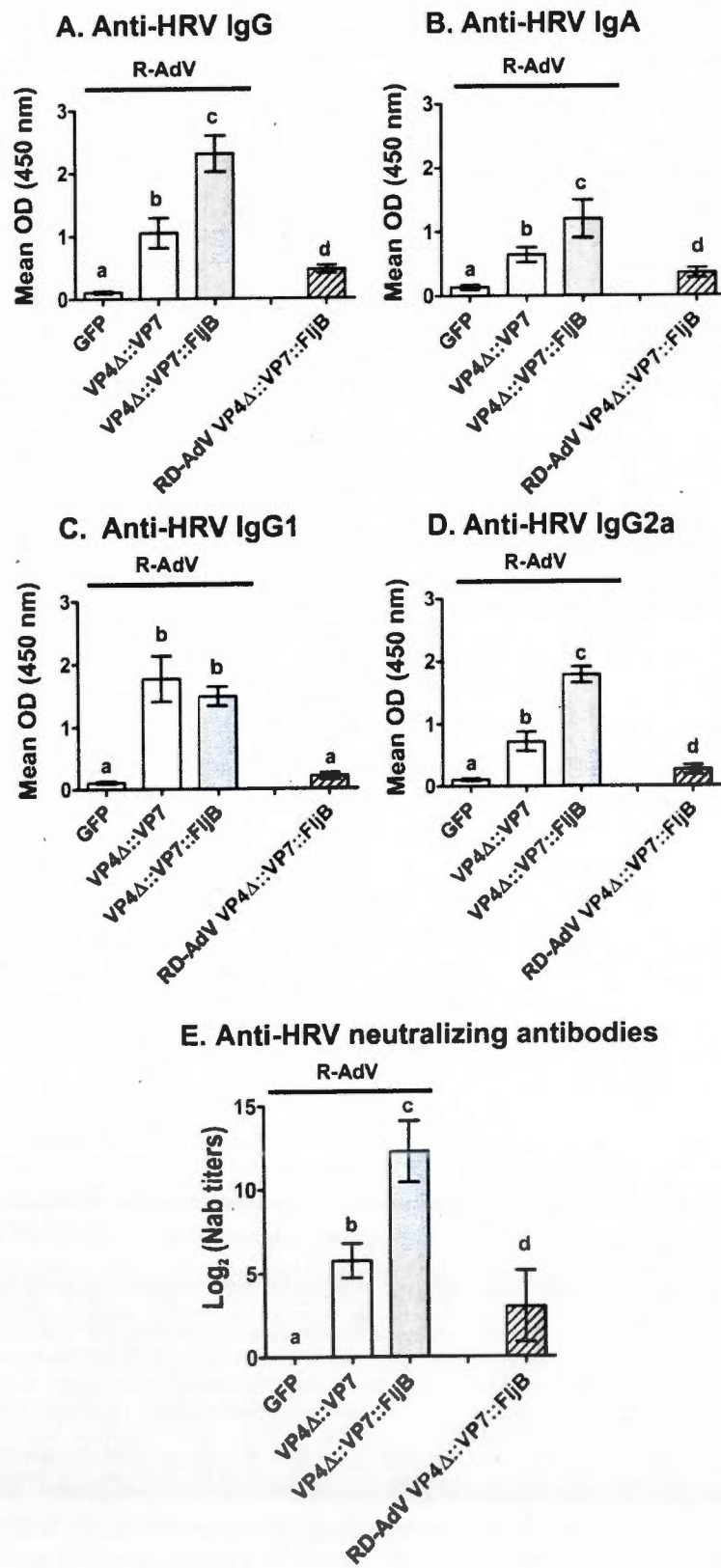


Figure 3.2 HRV-specific systemic antibody responses in mice immunized intrarectally with constructs expressing HRV immunogens either individually or fused to FljB.

Groups of mice were inoculated on day 0 with R-AdV expressing GFP, VP4 Δ ::VP7 or VP4 Δ ::VP7::FljB, or RD-AdV expressing VP4 Δ ::VP7. They were boosted on day 21 post-primary immunization (PPI). Sera were collected from each mouse on day 42 PPI for HRV-specific antibody response. Levels of anti-HRV IgG (panel A), IgA (panel B), IgG1 (panel C) and IgG2a (panel D) were evaluated by indirect ELISA. For each group of mice, columns represent the mean value of optical densities (\pm standard deviation). Panel E represents the mean of neutralization Ab titers (\pm standard deviation). Labelling of data with superscripts of different letters indicates significant differences between groups at $P < 0.05$.

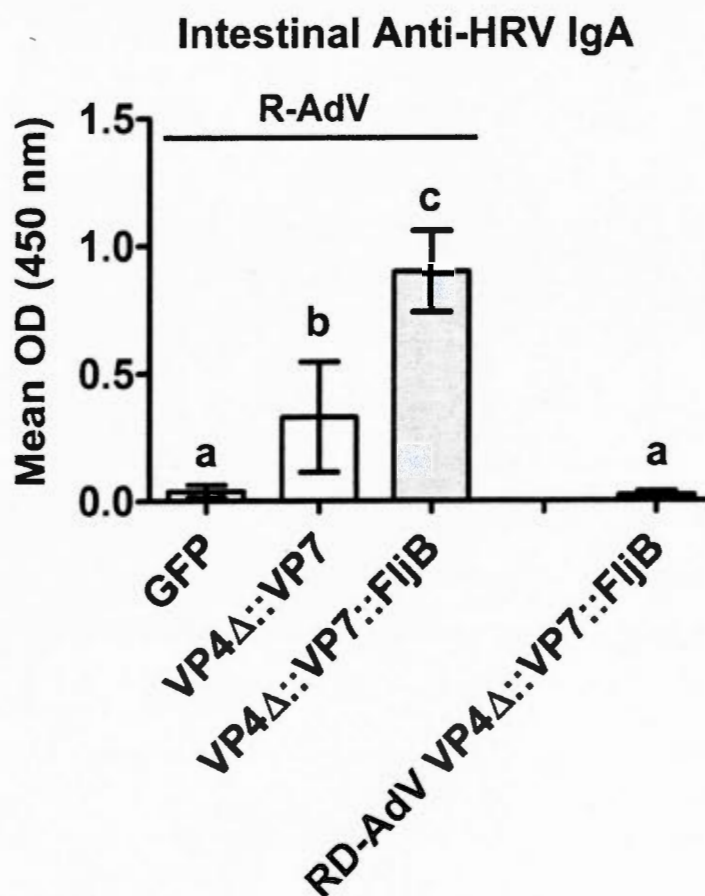


Figure 3.3 HRV-specific intestinal IgA response in mice immunized intrarectally with constructs expressing HRV immunogens either individually or fused to FljB.

Levels of anti-HRV IgA were evaluated by indirect ELISA in intestinal washes from each mouse of the groups described in the legend to Fig. 2, using purified HRV particles as antigen. For each group of mice, columns represent the mean value of optical densities (\pm standard deviation). Labelling of data with superscripts of different letters indicates significant differences between groups at $P < 0.05$.

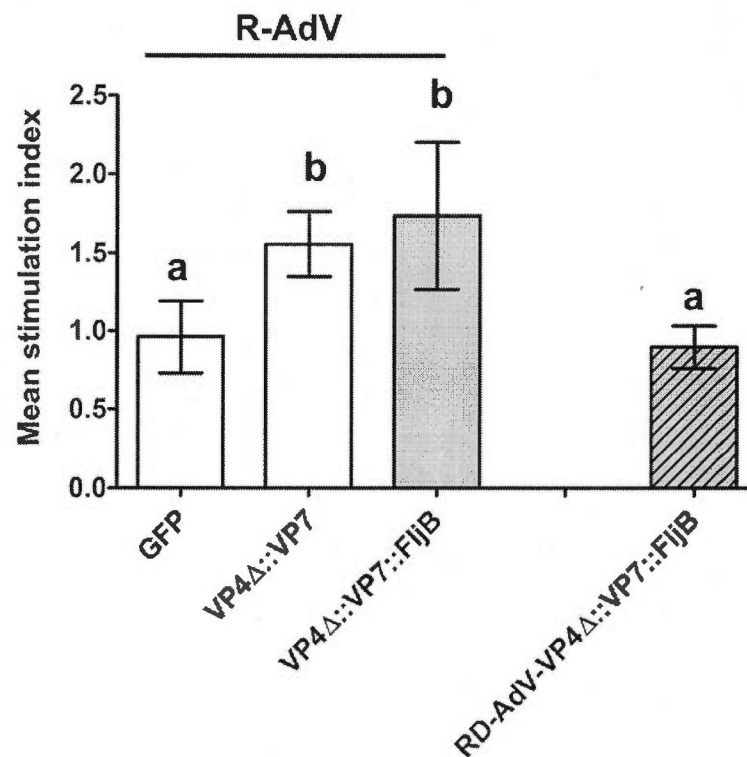
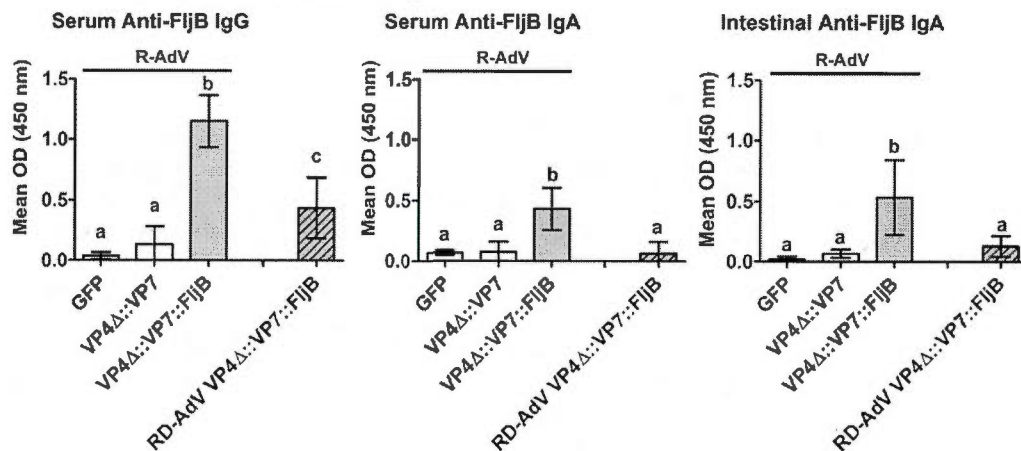


Figure 3.4 HRV-specific lymphoproliferative response from mice spleen cells on day 42 post primary immunization.

Columns represent the mean stimulation index (SI) values (\pm standard deviation) obtained for groups described in the legend to Fig. 3.2. Labelling of data with superscripts of different letters indicates significant differences between groups at $P < 0.05$.

A. Antibody response specific to FljB



B. Spleen lymphoproliferative response specific to FljB

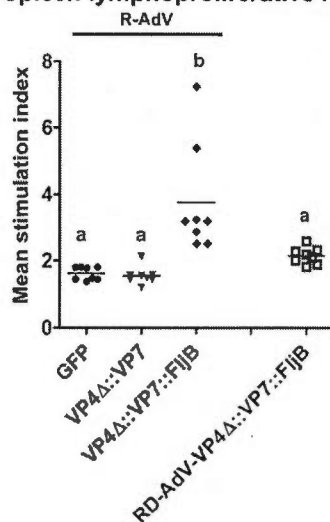


Figure 3.5 Systemic and intestinal immune responses specific to FljB in mice immunized intrarectally with constructs expressing HRV immunogens either fused or not to FljB.

Sera and intestinal washes were collected from each mouse of the groups described in the legend to Fig. 2 on day 42 post primary immunization for FljB-specific antibody response that was evaluated by indirect ELISA. Panel A: Serum anti-FljB IgG levels, serum anti-FljB IgA levels and intestinal anti-FljB IgA levels. For each group of mice, columns represent the mean value of optical densities (\pm standard deviation). Panel B: FljB-specific spleen white cell proliferative response. Columns represent the mean value of the SI (\pm standard deviation). Labelling of data with superscripts of different letters indicates significant differences between groups at $P < 0.05$.

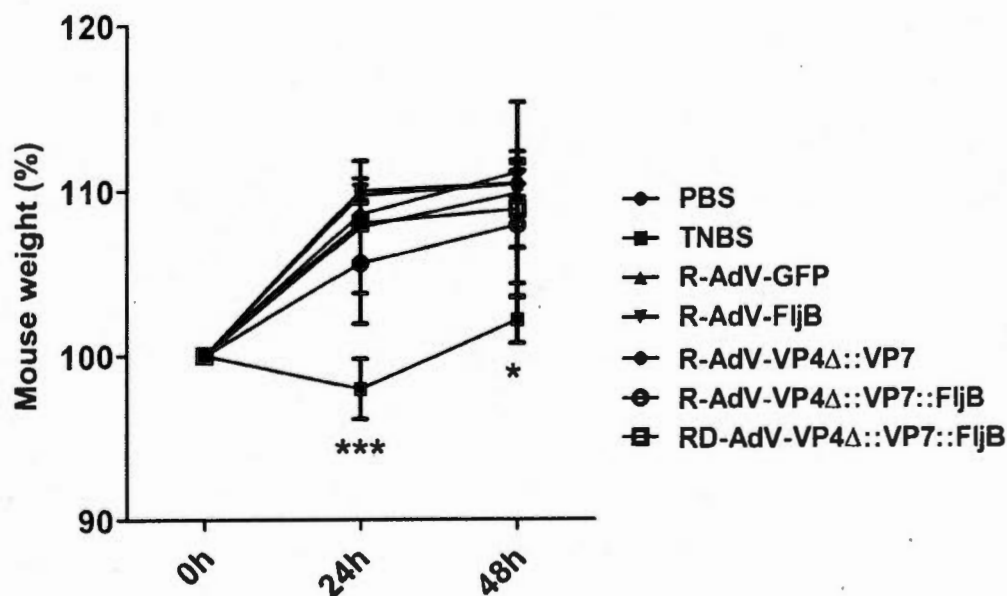
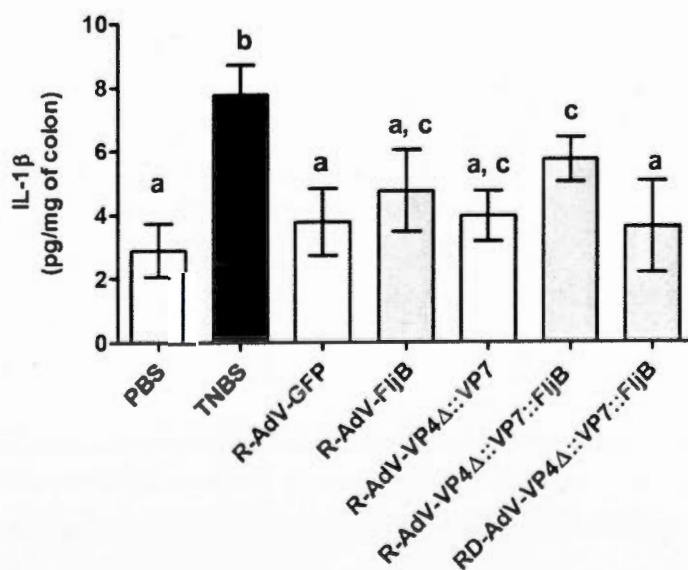
A.**B.**

Figure 3.6 Inflammation study in mice immunized intrarectally with R-AdV expressing GFP, FljB, VP4 Δ ::VP7, VP4 Δ ::VP7::FljB or with RD-AdV expressing VP4 Δ ::VP7::FljB.

Panel A: Evolution of mouse weight during 48 h post-intrarectal treatments. Mice of another group treated with TNBS served as the positive control group. The results

refer to the mean mouse weight percentage changes overtime. *** stands for $P < 0.001$ and * stands for $P < 0.05$. Panel B: IL-1 β production in colon homogenates, 48 h post intrarectal inoculations. Labelling of data with superscripts of different letters indicates significant differences between groups at $P < 0.05$.

3.5 Discussion

In the present study, we showed that R-AdVs expressing HRV immunogens are suitable vaccine delivery vectors for intrarectal immunization as demonstrated by the induction of both mucosal (intestinal) and systemic (serum) HRV-specific Ab responses. Using a number of immunogens including those derived from HRV, several studies demonstrated that protective immune responses are most efficiently mounted when induced by mucosal immunization (Belyakov et Ahlers, 2009; Liu et al., 2005; Mason et al., 2008; Neutra et Kozlowski, 2006; Silin et al., 2007). Although induction of mucosal immunity in the intestine is crucial in preventing or clearing rotaviral infection, oral delivery of subunit vaccines remains a challenging immunization route in light of potential immunogen degradation following passage through the gastrointestinal tract (Lugade et al., 2010; Plotkin, 2009; Silin et al., 2007) and/or development of immunogen-specific immunological tolerance (Mason et al., 2008; Simon et Kotloff, 2010). Intranasal administration of AdV (Liu et al., 2005) or virus-like particle (VLP)-based vaccines (Blutt et al., 2006b) were found to be more efficient in achieving protection against rotavirus infections in mice than oral administration. Complete protection can also be achieved in mice when using VLPs co-administered with cholera toxin through the intrarectal route (Parez et al., 2006). Consistently, the present study supports the use of intrarectal immunization in order to generate an intestinal immunogen-specific immune response. Finally, when compared to the intranasal route, intrarectal administration of an AdV-based vaccine was also shown to generate a higher intestinal immunogen-specific immune response (Zhu et al., 2008). Since AdVs, which are effective in gene transfer to epithelial cells, are susceptible to gastric acidic pH (Cheng et al., 2003), they may be a more suitable antigen delivery system for intrarectal than oral vaccination routes.

The effectiveness of replicating but disseminating AdVs has been shown in vaccine studies (Peng et al., 2005; Robert-Guroff, 2007). These vectors provide elements to stimulate innate immunity and to induce Ag-specific Ab and CMI responses (Liu, 2010; Robert-Guroff, 2007). However, safety is the major concern of using disseminating AdVs (Plotkin, 2009). In this study, dissemination was not possible, as the replication-competent platform used is a mutant AdV with a deletion in the PS gene (Oualikene et al., 2000).

Using an identical R-AdV system as reported herein, Bourbeau et al. demonstrated that AdV genome replication, enabled by the adenovirus early gene E1A, increased transgene expression as compared to non replicating AdV systems (Bourbeau et al., 2007). Our results demonstrated that not only R-AdV increased VP4 Δ ::VP7::FljB expression *in vitro* but also enhanced the immune response specific to HRV in mice when compared to a first generation RD-AdV system. Discrepancy in Ag expression levels *in vivo* may not be the only explanation for this result. Indeed, the expression of E1A encoding sequence of R-AdV is known to further enhance the immune response by activating the innate immune system through Toll-like receptor (TLR)-dependent and independent pathways, resulting in enhanced type I interferon (IFN) production and, presumably, enhanced vaccine potency (Huarte et al., 2006; Russell, 2009; Zhu et al., 2007).

In a previous study, we reported that systemic delivery of a R-AdV-prime/plasmid DNA-boost vector regimen, based on the delivery of the VP4 Δ ::VP7 fusion protein, induced the production of HRV-specific IgG and IgA bearing neutralizing properties, as well as a virus-specific CMI response. Mixed T_H1/T_H2 responses were also elicited as shown by the presence of anti-HRV IgG1 and IgG2a isotypes (Girard et al., 2013). Consistently, the R-AdV expressing VP4 Δ ::VP7 used in this study also raised such HRV-specific immune responses when delivered through the intrarectal route, in addition to anti-HRV IgA detected in intestinal

washes. Together, these correlates of immunity represent markers of protection against rotavirus infection (Franco et al., 2006; Plotkin, 2010).

The adjuvant property of flagellin was reported by Ahmed et al. (2010) who showed an increase in VSV-specific Abs following the administration of a VSV vector encoding *S. typhimurium* FliC flagellin (Ahmed et al., 2010). Another study also reported an increase of immunogen-specific serum IgA and IgG following the co-administration of plasmids encoding FliC and the immunogen, respectively (Applequist et al., 2005). Here we showed that intrarectal immunization with R-AdV expressing VP4Δ::VP7::FljB resulted in an enhanced HRV-specific Ab response when compared to that using the VP4Δ::VP7-expressing R-AdV. This study is the first to report the adjuvant properties of FljB when fused to virally delivered immunogens.

Although flagellins are extensively used as adjuvants in immunization studies where the immunogens are delivered via either the systemic or mucosal (e.g oral and intranasal) routes (Cuadros et al., 2004; Huleatt et al., 2007; Huleatt et al., 2008; Pino et al., 2005; Salman et al., 2009; Sarti et al., 2011), this study is the first to demonstrate their potential use through intrarectal delivery by AdVs. This delivery strategy using R-AdVs expressing either VP4Δ::VP7 or VP4Δ::VP7::FljB elicited an Ag-specific mixed T_H1/T_H2 immune response characterized by the presence of a HRV-specific CMI response, in addition to HRV-specific IgG1 and IgG2a production. Although FljB increased serum anti-HRV total IgG, IgA, and IgG2a levels, it did not increase anti-HRV IgG1 level. Such modulation of Ag-specific IgG isotypes is in agreement with that observed in other studies reporting the use of bacterially-expressed recombinant flagellins for mucosal immunization (Girard et al., 2011; Pino et al., 2005; Salman et al., 2009; Vicente-Suarez et al., 2009).

FljB used either alone or fused with VP4Δ::VP7 and delivered via R-AdV induced IL-1β production in J774A.1 macrophages. This activation of the innate

immune system is more likely the mechanism underlying the FljB-associated adjuvant effect observed in this study. Production of IL-1 β was previously shown in bone marrow derived macrophages infected with a retroviral vector expressing *L. pneumophila* FlaA, following NLR binding and, thereof, caspase-1 activation (Lightfield et al., 2008). Other studies reported that FliC delivered intracellularly by plasmid DNA or a VSV vector induced maturation of human monocytes and dendritic cells, respectively (Ahmed et al., 2010; Applequist et al., 2005). RD-AdV expressing FlaA from *L. monocytogenes* also induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells (Tosch et al., 2009). Alternatively, FljB activation of TLR5 is another possible underlying mechanism as the VP4 Δ ::VP7::FljB protein may be secreted/released by infected cells and then recognized by TLR5-expressing cells present in the intestinal microenvironment (Miao et al., 2007).

Intradermal administration of plasmid DNA expressing FliC in mice induced rapid acute local inflammation at the injection site, lasting seven days post-inoculation (Applequist et al., 2005). In our study, a subset of animals showed clinical signs of inflammation following intrarectal administration of R-AdV or RD-AdV. Although the *in vitro* study with J774A.1 macrophages showed that R-AdV expressing FljB fused with HRV proteins activated the innate immune response, the levels of IL-1 β were rather low in mouse colons 48 h following inoculation of these R-AdVs (Fig. 6). This outcome can be regarded in a positive light as the induction of a too high degree of inflammation in colons that would result in the development of tissue lesions is undesirable.

Detection of FljB-specific CMI and systemic/intestinal Ab responses following two intrarectally administrations of R-AdV encoding VP4 Δ ::VP7::FljB is in agreement with the observed immune response to flagellin following either natural infection with *S. typhimurium* (Alaniz et al., 2006; Merrell et al., 2004; Miao et al., 2007) or intramuscular administration of flagellin-adjuvanted formulations

(Bergeron-Sandoval et al., 2011; Didierlaurent et al., 2004; Huleatt et al., 2007). In a previous study, we reported that no FljB-specific immune response was detected following the oral administration of plant-derived recombinant FljB mixed with ovalbumin (Girard et al., 2011). This discrepancy may be attributed to the dose of flagellin/FljB used in conjunction with the immunization route and frequency of flagellin/FljB administration. Nevertheless one may argue that FljB-specific immune response observed here might hamper the subsequent use of this adjuvant. However, this concern is limited by the fact that pre-existing immunity to flagellin did not interfere with its adjuvant function when used with several antigens (Ben-Yedidia et Arnon, 1998; Honko et al., 2006).

This study showed that the R-AdVs are suitable vectors for HRV immunogen delivery through the intrarectal route. This immunization strategy engendered both HRV-specific Ab and CMI responses following the administration of vectors expressing VP4 Δ ::VP7. Moreover, this study is the first report demonstrating the suitability of FljB-adjuvanted fusion protein as a perspective strategy to increase immunogen-specific Ab response following the immunogen delivery by R-AdVs. Although these observations lay the foundation for using the R-AdV system and immunogens fused with FljB for developing effective subunit vaccines against rotavirus, additional studies are needed to ascertain the protective effect of this immunization strategy in animals experimentally infected with HRV.

3.6 Acknowledgements

A. Girard was supported by a graduate studentship from La Fondation UQAM. E. Roques received support from graduate studentships from FARE (Fonds de l'Accessibilité à la Réussite des Étudiants, University of Québec at Montréal) and CRIP (Centre de Recherche en Infectiologie Porcine, University of Montreal). This work was supported by research grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Canadian Institutes of Health Research (NSER/CIHR CHRP program) to Denis Archambault and Bernard Massie. We thank Dr. Harry B. Greenberg (Stanford University) and Dr. Dongwan Yoo (University of Illinois) for providing the HRV VP8*-specific mouse monoclonal antibody and the HRV Wa strain, respectively. We thank Dr. Andrea Gomez Corredor for helpful discussion, Dr. Peter Lee for editing the manuscript and Dr. Carolina Alfieri who has criticized the manuscript.

CHAPITRE IV

FLAGELLIN PRODUCED IN PLANTS IS A POTENT ADJUVANT FOR ORAL IMMUNIZATION

Aurélie Girard¹, Wilfried Saron¹, Louis-Philippe Bergeron-Sandoval,
Fathey Sarhan and Denis Archambault.

¹ First Authors (equal contribution): Aurélie Girard and Wilfried Saron

Authors' affiliation: University of Québec at Montréal, Department of Biological
Sciences, P.O. Box 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C
3P8.

Ce chapitre présenté sous forme d'article scientifique a été accepté pour publication dans la revue *Vaccine*. La conception et la rédaction du manuscrit ont été faites par l'auteur de cette thèse. La réalisation et l'analyse des expériences ainsi que le montage des figures ont été réalisés par l'auteur de cette thèse à l'exception de la production de protéine recombinante dans les plantes transgéniques et des expériences d'analyse des lavages intestinaux de souris par la technique ELISA. Ces dernières expériences ont été réalisées par Wilfried Saron qui a aussi été impliqué dans les essais d'immunisations et recueils des échantillons. Louis-Philippe Bergeron-Sandoval a développé le système d'expression de la flagelline recombinante dans les plantes transgéniques. Le Docteur Fathey Sarhan a supervisé la production de plantes transgéniques et a corrigé le manuscrit. Le Docteur Denis Archambault a participé à la conception des expériences, supervisé le projet et corrigé le manuscrit. Tous les auteurs ont discuté des résultats, révisé et approuvé le manuscrit final. La référence de cet article se retrouve à la fin de cette thèse.

4.1 Abstract

The aim of this study was to produce adjuvant with high biosafety, efficacy and low cost. Towards this goal, the plant *Nicotiana benthamiana* transient expression system was successfully used to express *Salmonella typhimurium*'s flagellin (FljB). The yield of the expressed FljB was 280 mg per kg of fresh weight (FW) leaves. The lyophilized plant powder containing plant expressing FljB was mixed with ovalbumin (OVA) and used for oral immunization of BALB/c mice. The ELISA analysis showed higher and accelerated OVA-specific serum antibody responses in mice given the mixture when compared to animals receiving OVA alone. Furthermore, FljB elicited a mixed Th1/Th2 response as shown by the presence of specific anti-OVA IgG1, IgG2a and IgG2b isotypes. OVA-specific IgAs were also detected in mice given the mixture. Cell-mediated immune response to OVA was induced by FljB as determined by a spleen lymphocyte specific proliferation test. No immune response was generated against FljB. In conclusion, our results showed for the first time the production of FljB in plants and the efficient use of the crude lyophilized extract as an adjuvant for oral immunization.

Keywords: Flagellin, adjuvant, transgenic plant, oral immunization.

4.2 Introduction

Although mucosal surfaces represent the main entry for many infectious agents, the majority of commercial vaccines used to prevent these infectious diseases are administered through injections notably the vaccine against influenza and hepatitis A viruses (Plotkin, 2005). However, experimental systemic vaccines failed to generate protection against mucosal pathogens associated with chronic diseases such as human immunodeficiency virus 1 (HIV-1), herpes viruses, hepatitis C virus and *Mycobacteria* (Belyakov et Ahlers, 2009; Belyakov et al., 2001; Kozlowski et al., 1997; Neutra et Kozlowski, 2006; Wang et al., 2004). These observations demonstrate the need of other strategies like mucosal immunization to achieve protection (Belyakov et Ahlers, 2009). Indeed, several studies demonstrated that protective mucosal responses are most efficient when induced by mucosal immunization compared to systemic administered vaccines (Belyakov et Ahlers, 2009; Mason et al., 2008; Neutra et Kozlowski, 2006; Silin et al., 2007). In addition, mucosal vaccines have the ability to induce antibody production and cell-mediated immune (CMI) response at both systemic level and mucosal sites (Neutra et Kozlowski, 2006).

Delivery of vaccines by oral route has been considered for years in vaccinology research because of their capacity to trigger mucosal immunity and their ease of administration, without the use of needles that may cause unnecessary pain and local infection in patients. In spite of these advantages, oral delivery remains a challenging immunization route because of possible antigen degradation in the gastrointestinal tract (Lugade et al., 2010; Plotkin, 2009; Silin et al., 2007) and development of immune tolerance (Mason et al., 2008; Simon et Kotloff, 2010). The intestinal mucosal immune system protects the body against infections but also against harmful immune responses caused by ingested foreign molecules which

otherwise can be immunogenic when introduced upon injection (Mowat et al., 2004). It is well known that orally administered non-pathogenic antigens induce tolerance that can inhibit subsequent systemic immune responses (Mowat, 2003; Mowat et al., 2004).

Commercial oral vaccines, such as polio and rotavirus vaccines are exclusively composed of living attenuated organisms that replicate in the intestine (Bishop, 2009; Ehrenfeld et al., 2009; Plotkin, 2009; Soares-Weiser et al., 2010). However regain of virulence is a potential risk associated with live vaccines (Plotkin, 2009). Thus, other approaches to develop oral vaccines with non-living pathogens are needed (Ehrenfeld et al., 2009; Plotkin, 2009; Soares-Weiser et al., 2010). Plants are considered an attractive production system for vaccines because of their low cost and the ease of large scale production (Davoodi-Semiromi et al., 2009). Moreover, plant-based vaccine vectors do not represent any biosafety concerns since plant pathogens do not replicate in animal and humans (Daniell et al., 2009; Granell et al., 2010; Vezina et al., 2009). Considering these advantages, H5N1 influenza virus-like particles (VLPs) were produced in plants as an alternative to egg-based vaccine manufacturing. Clinical trials indicate good safety profile and promising immunogenicity of such plant-produced VLPs in humans (Landry et al., 2010). In addition, plant-based edible vaccines do not require protein purification, and are easy to store and deliver (Sala et al., 2003). Despite these advantages, no plant-based vaccines are currently available for commercial purposes.

Plant-based vaccines are defined as recombinant proteins produced in plants using either transient or stable expression technology (Daniell et al., 2009; Vezina et al., 2009). In both systems, antigens are expressed in plant tissues from which they can be purified and processed for oral delivery. The advantage of the transient expression system over stable transformation is the rapidity and low cost of production (Daniell et al., 2009; Vezina et al., 2009). This approach is suitable for

proof of concept experiments and the preliminary evaluation before moving to the time consuming stable transformation system.

Unlike live-attenuated vaccines, most killed pathogen and new generation vaccines, such as subunit and plant-based vaccines, often lack efficacy to induce optimal immune responses (Mishra et al., 2010; Silin et al., 2007). As a result, development of such vaccines require the use of adjuvant to modulate and/or enhance the immune response to antigens (Reed et al., 2009). Adjuvants are classified into two categories; the first is the vehicles (for example, mineral salts, emulsions, liposomes, virosomes, ISCOMs) that optimize antigen delivery and presentation to the immune system (Reed et al., 2009; Sun et al., 2009). The second is the immunomodulating agents for instance, Toll-like receptor (TLR) ligands, cytokines, bacterial toxins that enhance the immune response (Reed et al., 2009). Although the vehicle-type adjuvants such as Alum (aluminium hydroxide gel) and Squalene MF-59TM are extensively used in human vaccine formulation, no immunomodulating adjuvant has been approved for systemic vaccination in humans (Gosselin et al., 2009; Plotkin, 2009; Reed et al., 2009; Silin et al., 2007). In addition, there is no adjuvant commercially available for mucosal vaccines (Silin et al., 2007). Thus advances in new adjuvant and delivery strategies will greatly improve the efficacy of mucosal immunization (Belyakov et Ahlers, 2009).

Among mucosal/oral adjuvants are bacterial derivatives, namely the subunit B of cholera toxin (CTB) and the *Escherichia coli* (*E. coli*) thermolabile genetically modified toxin (LT) (Plotkin, 2009; Summerton et al., 2010). Plant lectins, saponin and TLR-ligands constitute other potential mucosal adjuvants (Cooper et al., 2008; Granell et al., 2010; Lavelle et al., 2001; Murad et Clay, 2009). Among the TLR-ligand group is flagellin, a structural protein that forms the flagellar filament of Gram-negative bacteria (Yonekura et al., 2005). Flagellins possess highly conserved domains among Gram-negative bacteria species and constitute a Pathogen-Associated

Molecular Pattern (PAMP) recognized by TLR5 expressed at the surface of epithelial and immune system cells (Miao et al., 2007). Binding of monomeric flagellin to TLR5 initiates an immune response and results in the translocation of the NF- κ B transcription factor to the nucleus to transactivate genes encoding inflammatory cytokines such as interleukin-8 (IL-8), tumor-necrosis-factor- α (TNF- α), and IL-6, and chemoattractant CCL20 that recruits polymorphonuclear granulocytes to mucosal tissues such as the lung and intestine epithelia (Gewirtz et al., 2001a; Rhee et al., 2004). In addition, TLR5 ligation usually leads to DC maturation (IL-12 production and B7 expression (Pino et al., 2005)) resulting in robust activation of Th1 immune responses (Means et al., 2003). Thus FljB links innate and adaptive immunity through TLR5 binding (Rhee et al., 2004; Rhee et al., 2006; Sierro et al., 2001).

Mucosal adjuvant properties and efficacy of *Salmonella typhimurium* FljB were described in several studies (Bargieri et al., 2010; Honko et al., 2006; Lee et al., 2006; Miao et al., 2007; Pino et al., 2005; Salman et al., 2009; Takata et al., 2006), including those for the development of influenza vaccines using recombinant FljB protein expressed in *E. coli* (Huleatt et al., 2008; Skountzou et al., 2010; Song et al., 2009). However, it is important to develop other methods with low cost and procedural simplicity to produce flagellin to use as adjuvant. Towards this goal, the plant transient expression system in *Nicotiana benthamiana* (tobacco) was used to produce FljB which was thereafter evaluated for its adjuvant potential. Systemic and mucosal specific immune responses were monitored in mice following oral administration of ovalbumin, a model antigen used in several studies (Huleatt et al., 2007; Oliveira et al., 1998; Plebanski et al., 2010; Sun et al., 2010; Tincer et al., 2011), and the lyophilized plant leaves expressing FljB as adjuvant. The adjuvant properties of plant-produced FljB were also compared with those of FljB produced in *E. coli*.

4.3 Material and methods

4.3.1 Transient expression of FljB in *Nicotiana benthamiana*

Nicotiana benthamiana plants were grown in growth chambers in a 1:1:1 mixture of black earth, ProMix (Premier) and vermiculite, at a temperature regime of 25°C day / 21°C night with a 16 h photoperiod. Two weeks after seeding, plantlets were potted individually and grown under the same conditions for two additional weeks. For transient expression assays, the pCambia1380 FljB and pCambia1380 GFP (used as a negative control) plasmid constructs were used for *Agrobacteria* transformation as described with slight modifications (Bergeron-Sandoval et al., 2011). Briefly, transformed *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1 were grown in Luria Bertani (LB) medium containing ampicillin and kanamycin (Fisher Scientific, Ville St-Laurent, Qc, Canada) until they reached an $OD_{(600\text{ nm})}$ of 0.8. *Agrobacteria* suspensions were centrifuged ($5000 \times g$, 10 min, 4°C) and resuspended in the infiltration medium [5g/L Murashige and Skoog Basal salt (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 10 mM 2-(N-morpholino)-ethane sulfonic acid, pH 5.6 (Sigma-Aldrich), 200 μ M acetosyringon, 58 mM sucrose] (Kane et al., 2007). These bacteria were mixed at a 1:1 ratio with a suspension of *Agrobacteria* carrying the P19 suppressor of post-transcriptional gene silencing in order to enhance transient expression of the heterologous constructs (Kane et al., 2007). Following *Agrobacteria* infiltration through leaves, plants were grown for 7 days. *Agrobacteria*-infiltrated plant leaves were harvested, frozen in liquid nitrogen, grounded into a fine powder using a mortar and pestle, lyophilized (Benchtop SLC; VirTis, Stone Ridge, NY, USA) and stored. Powder of crude lyophilized plant leaves, designated hereafter as plants expressing FljB or control (in the case of GFP) plants, was used in mouse immunization protocol.

4.3.2 Production and purification of recombinant FljB in *E. coli*

For adjuvant comparison purposes, recombinant FljB was produced in *E. coli* and purified as previously described (Bergeron-Sandoval et al., 2011). Briefly, FljB gene was cloned into pTrcHisB expression vector (Invitrogen, Carlsbad, ON, Canada) and proteins were purified on Ni-NTA-His-Bind® resin (Novagen, Madison, WI, USA) under denaturing conditions according to the manufacturer's manual and as described elsewhere (McDermott et al., 2000). Proteins were dialyzed against a phosphate-buffered saline solution (PBS, pH 7.3), and qualitatively evaluated by SDS-PAGE and immunoblotting using horseradish peroxidase (HRP)-coupled goat anti-His antibodies (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Purified His-tagged FljB was quantified using a Lowry Protein Assay (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) and stored at -80°C until used.

4.3.3 Characterization of recombinant FljB produced in plants and in *E. coli*

For immunoblot analyses, both bacteria-expressed and plants expressing FljB proteins were separated on 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad). Blots were saturated with PBS-Tween 20 (0.05 % v/v) (PBS-T) containing 5% (w/v) powdered skimmed milk, and then incubated at room temperature with rabbit anti-FljB antibodies (Bergeron-Sandoval et al., 2011) at a 1:20,000 dilution. Detection of the proteins was performed using an HRP-coupled goat anti-rabbit-IgG antibody (1:10,000) and the HyGLO chemiluminescence HRP antibody detection reagent kit (Denville Scientific Inc., Metuchen, NJ, USA).

Quantity of FljB expressed in the infiltrated plants was estimated by immunoblot. Briefly immunoblots of different plant sample dilutions and known amounts of recombinant FljB proteins expressed in *E. coli* were analyzed by densitometry of the X-ray films with the Quantity One software (Bio-Rad). The

stability of the FljB protein in lyophilized plant powder was determined by the functional antigenicity of the protein using immunoblotting.

4.3.4 Immunization of mice

Animal protocols were approved by the University's Animal Protection Institutional Committee according to the regulations of the Canadian Council for Animal Care. Six-week-old female BALB/c mice were purchased from Charles River (St-Constant, QC, Canada) and assigned in five groups of eight individuals. Mice were immunized on days 0, 10, 20, 27, 34, and 41. Before immunization, mice were fasted for six hours with free access to water. Gastric acidity was neutralized by gavage using a blunt-ended probe with 100 μ l of 4 % calcium carbonate 1 h before immunization (Rigano et al., 2006). Each group of mice received by gavage one of the following immunization treatments: (i) Control (Ctrl): PBS, 100 μ l; (ii) OVA (Grad III, Sigma-Aldrich): 100 μ g dissolved in 100 μ l PBS; (iii) OVA-rFljB: OVA (100 μ g) and purified FljB (20 μ g) produced from *E. coli* dissolved in PBS to a final volume of 100 μ l; (iv) OVA-Plant(FljB): OVA (100 μ g) and 6.1 mg of plants expressing FljB (containing 20 μ g of FljB) adjusted to a final volume of 100 μ l with PBS; and (v) OVA-Plant(Ctrl): OVA (100 μ g) and 6.1 mg of lyophilized control plant powder adjusted with PBS to a final volume of 100 μ l. Following the gavage procedure, mice were fasted 1 h with free access to water.

4.3.5 Sample collection

Blood samples were collected from the mandibular vein before antigen administration (day 0) and at days 10, 20, 27, 34, and 41 post primary immunization (PPI). At each time point serum samples were pooled for each group of mice. On day 48 PPI, blood was obtained from cardiac blood puncture in mice under anaesthesia with isoflurane (Fisher Scientific). Following clotting, samples were centrifuged (600 \times g at room temperature for 10 min) and the resulting sera were stored at -20 $^{\circ}$ C until

analysis. Spleens were collected aseptically, crushed with a 5 ml sterile syringe piston for spleen cell separation. Red blood cell lysis was performed using 0.83% ammonium chloride buffer (Sigma-Aldrich). Small intestines were removed and washed with 5 ml of cold washing buffer [PBS, 25 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma-Aldrich), 1% bovine serum albumin (BSA, Fisher Scientific) and complete protease inhibitor cocktail (Roche, Laval, QC, Canada)] (Abdul-Wahid et Faubert, 2007). Intestinal contents were centrifuged at 3,500 \times g, at 4°C for 15 min and supernatants were stored at -80°C.

4.3.6 Indirect ELISA

4.3.6.1 Serum anti-OVA and anti-FljB antibodies

The presence of serum OVA- and FljB-specific antibodies was evaluated by an indirect ELISA procedure. Wells of 96-well Costar ELISA plates (Fisher Scientific) were coated with 10 μ g OVA per well or 1 μ g *E. coli*-expressed purified recombinant FljB diluted in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) to a final volume of 100 μ l. Following an overnight incubation at 4 °C, plates were washed 4 times with PBS-T and then saturated with 150 μ l of PBS-T with 1% BSA for 1 h at 37°C. For anti-OVA IgG titration assay, 100 μ l of two-fold serial serum dilutions (made in PBS-T with 1% BSA) starting with a 1:8 dilution were added into wells (two wells per dilution) and incubated for 3 h at 37°C. For isotype detection of OVA-specific IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgA, sera were diluted 1:100 and 100 μ l of each dilution were added to wells for 3 h at 37°C. For detection of FljB-specific IgGs, sera were diluted 1:8 and 100 μ l were incubated for 3 h at 37°C.

Plates were washed as described above and HRP-conjugated goat anti-mouse total IgGs (HRP-IgG) diluted 1:20,000 in PBS-T containing 1% BSA or HRP-conjugated goat anti-mouse IgG1 (1:10,000), IgG2a (1:5,000), IgG2b(1:5,000), or IgA (1:5,000) (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) were added for 1

h at 37°C. Plates were washed and HRP signal was detected by adding 100 µl 3, 3', 5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB, Sigma-Aldrich) per well. Reaction was stopped after 30 minutes at room temperature by adding 50 µl 1 M H₂SO₄ to each well, and optical density (OD) was determined at 450 nm (using Tecan Infinite M1000 reader, Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland). For titration assay, the end titers of each pooled or, where indicated, individual serum samples were determined as the last dilution of sample giving a mean OD superior to two-fold the mean OD obtained from negative control mouse serum. For isotype detection assay, results were expressed as the mean OD of three independent tests for each group of mice.

4.3.6.2 Intestinal OVA and FljB-specific antibodies

Presence of ovalbumin- or FljB-specific IgGs and IgAs in individual mouse intestinal wash was analysed by indirect ELISA. Coating, washing and blocking steps were performed as described above. A 1:2 dilution of intestinal wash (100 µl) was used and incubated for 3 h at 37°C. All samples were run in duplicates. Plates were washed and HRP-conjugated secondary goat anti-mouse IgG (1:20,000) and IgA antibodies (1:1,000) were added for 1 h at 37°C. The assay was repeated three times. A blank (two wells for each sample) was performed in the same condition on the same plate for which OVA or FljB proteins were replaced by BSA (10 µg per well) in the coating buffer. The results were expressed as corrected mean OD values after subtracting the blank.

4.3.7 Spleen lymphocyte proliferation assay

Spleen white cells from each mouse were suspended in RPMI cell culture medium (Invitrogen) supplemented with penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100 ug/ml) (Invitrogen), 10% fetal bovine serum (FBS, PAA Laboratories Inc., Etobicoke, ON, Canada), 0.05 mM β-mercaptoethanol (Fisher Scientific) and 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, Invitrogen), and seeded in

each well of 96-well plates at a concentration of 4.0×10^5 cells per well. Quadruplicate wells received either OVA (10 $\mu\text{g/ml}$), recombinant FljB (5 $\mu\text{g/ml}$), Concanavalin A (Con A, Sigma-Aldrich) (1.5 $\mu\text{g/ml}$) used as a positive control of lymphocyte functional activity, or cell culture medium (control cell cultures). The cell cultures were incubated for 4 days at 37°C. All cultures were pulsed with 0.5 μCi of tritiated thymidine (specific activity, 6.7 Ci/mmol; Perkin Elmer, Woodbridge, ON, Canada) 24 h before harvesting cells on a Wallac silica membrane (Perkin Elmer). The incorporated radioactivity was measured with Wallac Microbeta 1450 Trilux liquid scintillation counter (Perkin Elmer). The cell blastogenic responses were expressed by calculating the stimulation index (SI) which represents the ratio of the mean counts per minute (CPM) incorporated by the antigen or mitogen-containing cell cultures to the mean CPM incorporated by the control cell cultures.

4.3.8 Statistical analysis

The mean SI, antibody OD or IgG titers values for each group of mice were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey's multiple comparison test by using GraphPad Prism 5 software.

4.4 Results

4.4.1 Yield and stability of recombinant FljB in plants

Plants were agroinfiltrated with pCambia1380 FljB construct for protein production in *Nicotiana benthamiana* leaves. No visible damage or necrosis was observed on the transformed leaves after infection. The agroinfiltrated leaves were frozen in liquid nitrogen, ground into fine powder and then lyophilized for storage. The level of FljB in transformed leaves was estimated by scanning immunoblots of serial dilutions of known quantity of purified FljB expressed in *E. coli* using the Biorad Quantity One program software. The analysis indicated that the yield of the expressed FljB was 3.3 mg per gram of lyophilized plant powder which corresponds to an amount of 280 mg of FljB per kg of plant fresh weight (FW). This protein quantity falls within the 100-400 mg/kg FW range of tobacco leaves obtained for therapeutic or vaccine purposes (Daniell et al., 2009). FljB stability in the lyophilized plant leaves powder was also determined in term of antigenicity after 7 months of storage at room temperature. As shown in Fig. 4.1, both plant protein level (as determined by Coomassie blue staining of a SDS-PAGE) and FljB antigenicity (as determined by immunoblotting) were intact after seven months of storage, indicating the stability of plant expressing FljB in powder form over time.

4.4.2 Plants expressing FljB enhance antibody response to OVA

The kinetics of ovalbumin (OVA)-specific antibodies (IgG) in pooled sera, as determined by ELISA, is shown in Fig. 4.2A. Serum anti-OVA IgGs were detected as early as 20 days PPI in the OVA-Plant(FljB) group, whereas these antibodies were first detected on day 34 PPI for the OVA-rFljB and OVA-Plant(Ctrl) groups, and on day 41 PPI for the OVA group. The groups immunized with OVA mixed with either plants expressing FljB [OVA-Plant(FljB)] or purified FljB expressed in bacteria (OVA-rFljB) and used as an adjuvant positive control, showed high antibody

response at the end of experiment (day 48 PPI). Antibody titers in both groups of mice at 48 days PPI were similar and were about 30 times higher than those obtained from mice immunized with OVA alone or OVA mixed with powder from control plant leaves [(OVA-plant(Ctrl))]. A similar result was obtained at day 48 PPI when individual mouse sera were tested, showing a significant difference ($P \leq 0.01$) between titers of the two groups of mice receiving FljB and those of the two FljB-untreated groups (Fig. 4.2B). Altogether the results indicate that FljB expressed in plants enhances and accelerates the immune response to ovalbumin.

The above results prompted us to analyse the antibody immune response in terms of antibody isotypes and IgG subclasses on sera collected from individual mice at day 48 PPI. Anti-OVA IgG1s, typical of a Th2 immune response, were detected in the four groups of animals immunized with OVA, the highest antibody levels being observed in the OVA-Plant (FljB) and OVA-rFljB groups of mice (Fig. 4.3A). OVA-Plant (FljB) and OVA-rFljB groups of mice also showed significant levels of anti-OVA IgA when compared to the OVA and OVA-Plant(Ctrl) groups (Fig. 4.3B). In addition, significant levels of anti-OVA IgG2a and IgG2b (typical of a Th1 immune response) were detected only in the OVA-Plant (FljB) and OVA-rFljB groups (Fig. 4.3C and D). No Th1 immune response was observed in groups of mice given OVA alone or OVA mixed with control plant extract. These results clearly showed that oral immunization with OVA and Plant (FljB) or with OVA and rFljB resulted in both Th1 and Th2 immune responses. Finally, the highest levels of ovalbumin-specific IgA (Fig. 4.4A) and IgG (Fig. 4.4B) antibodies in intestinal washes were detected in mice which received OVA with either plants expressing FljB or rFljB. Taken together, these results show that plants expressing FljB constitute a potent adjuvant for oral immunization.

4.4.3 Plants expressing FljB induce cell-mediated immune response to OVA

The CMI response to OVA was evaluated in spleen white cells collected from individual mice at the end of experiment (e.g. at day 48 PPI) using a specific lymphocyte proliferation test. As shown in Fig. 4.5A, the OVA-Plant (FljB)- and OVA-rFljB-treated groups of animals showed positive lymphocyte response to ovalbumin stimulation ($SI \geq 2.00$) with mean SI values of $2.56 (\pm 0.75)$ and $2.10 (\pm 0.42)$, respectively. The difference between these two groups was not significant. Control group of mice given PBS (Ctl) as well as the OVA and OVA-Plant(Ctrl) groups of mice did not show ovalbumin-specific lymphocyte activity ($SI < 2.00$). All groups of mice showed positive spleen lymphocyte polyclonal activation to Con A stimulation with mean SI values ranging from 48.6 to 87.7 indicating lymphocyte functional activity.

4.4.4 Plants expressing FljB do not generate immune response to FljB

To determine whether an immune response was developed against the adjuvant, the antibody and cell-mediated immune responses specific to FljB were evaluated. As shown in Fig. 4.5B, no significant SI values ($SI < 2.00$) were observed in groups of mice immunized with FljB (either OVA-rFljB or OVA-plant (FljB) groups). In addition, no antibody directed against FljB was detected in serum (Fig. 4.6A) or intestinal washes from these groups of mice (Fig. 4.6B and C).

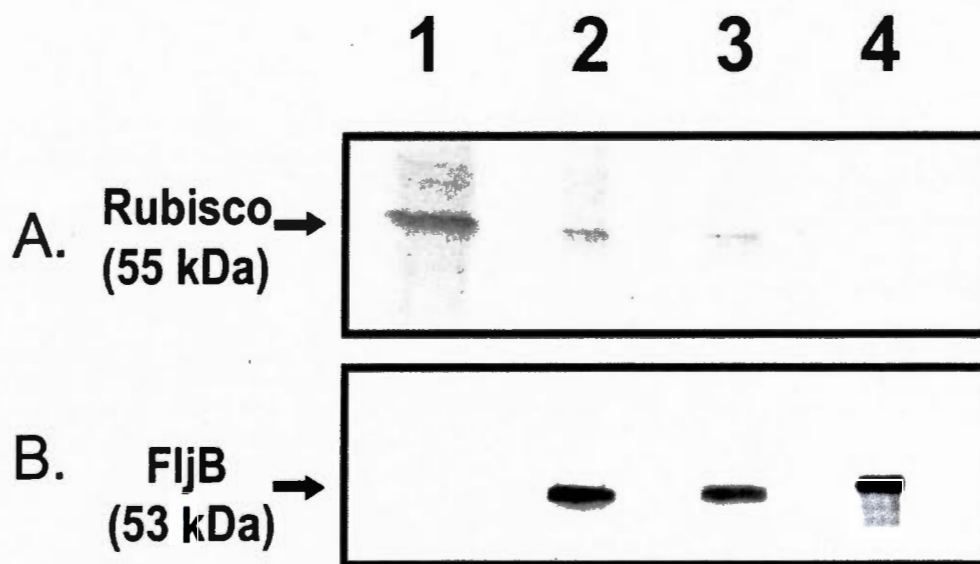


Figure 4.1: Stability of FljB expressed in *N. benthamiana*.

Panel A, SDS-PAGE/Coomassie-blue staining of soluble proteins; panel B, Immunoblot of FljB. Lane 1. Total soluble protein extract from lyophilized leaves powder agroinfiltrated with the GFP construction. Lane 2. Total soluble proteins from powder of fresh lyophilized leaves agroinfiltrated with the FljB construction. Lane 3. Same extract concentration of plants expressing FljB after 7 months storage. Lane 4. His-tag FljB expressed in bacteria. Immunoblot was done with an anti-FljB rabbit hyperimmune serum as primary antibody (1:20,000) and an anti-rabbit IgG-HRP (1:10,000) as secondary antibody. SDS-PAGE/Coomassie blue-stained gel was a replicate of the immunoblot to estimate the loading using RubisCo protein as standard.

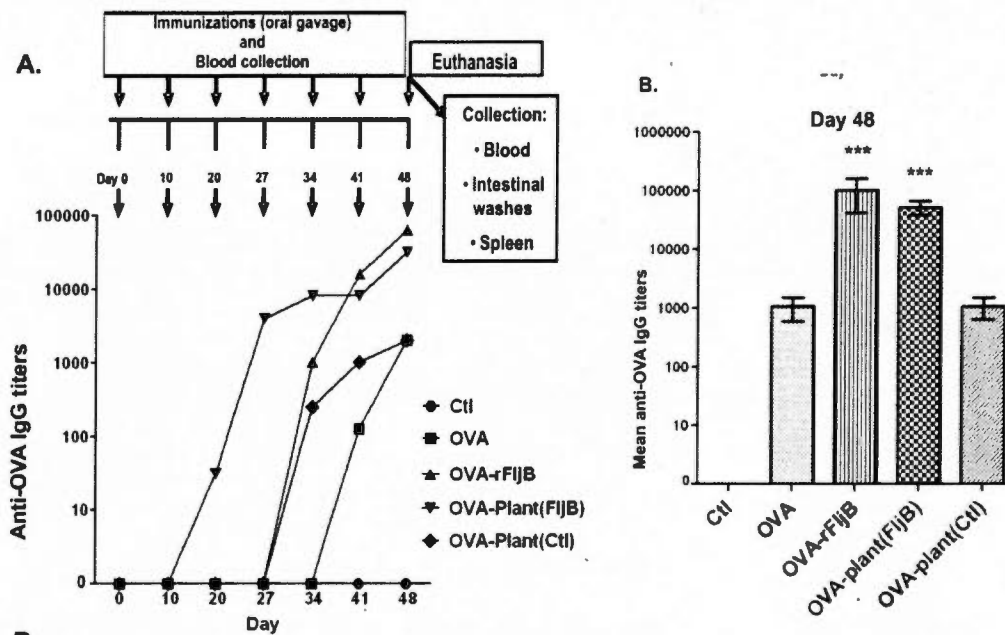


Figure 4.2: Experimental design and production of serum OVA-specific IgGs in orally-immunized BALB/c mice.

Panel A: Kinetics of IgG titers as determined with indirect ELISA using OVA as antigen and pooled mouse sera from each experimental group, namely Control (Ctl), OVA, OVA-rFljB, OVA-Plant(FljB) and OVA-Plant(Ctl). Panel B: IgG titers at day 48 PPI from serum of individual mice within each group. For each group of mice (n=8), column represents the mean value of IgG titers (+/- standard deviation). The values of the OVA-rFljB and OVA-Plant(FljB) groups were significantly different from that of the OVA group at $P \leq 0.001$ (***) using ANOVA.

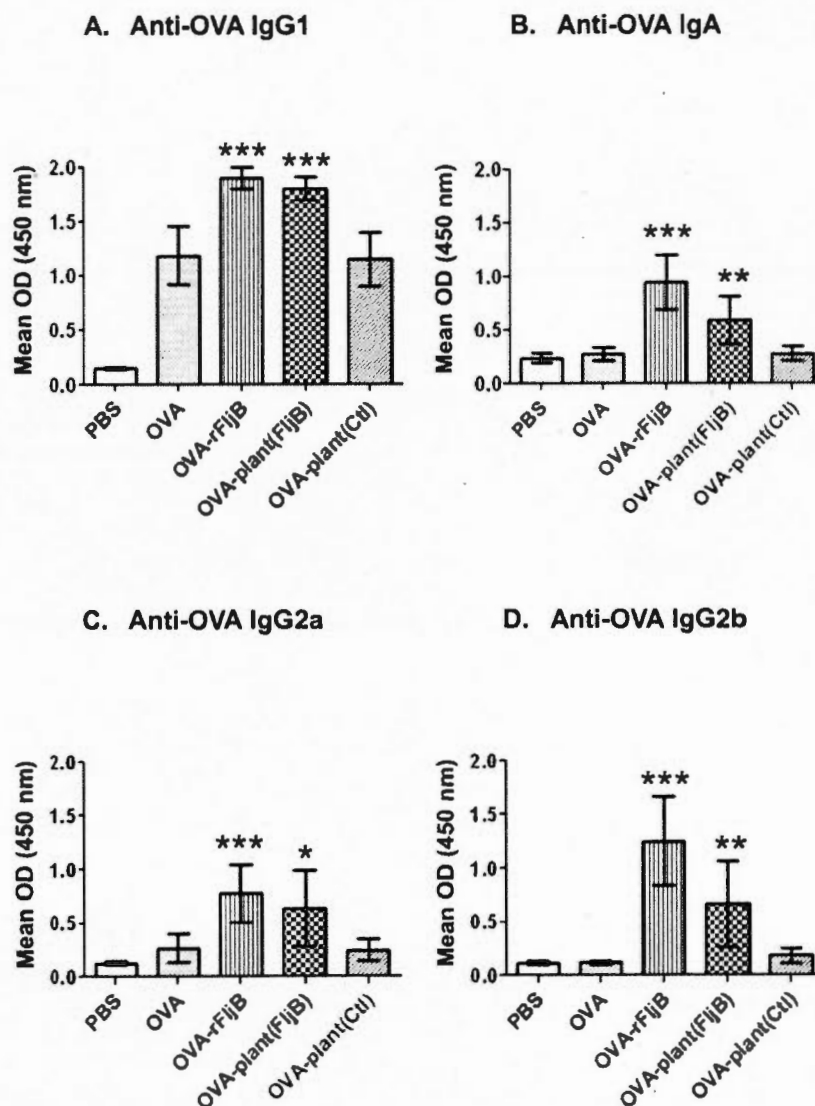


Figure 4.3: Serum OVA-specific antibody isotype production in orally-immunized BALB/c mice.

ELISAs were performed using OVA as antigen and OVA-specific IgG1 (panel A), IgA (panel B), IgG2a (panel C) and IgG2b (panel D). Antibody production was detected at day 48 PPI from serum of individual mice within each experimental group, namely Control (Ctl), OVA, OVA-rFljB, OVA-Plant(FljB) and OVA-Plant(Ctl). For each group of mice (n=8), column represents the mean OD (+/- standard deviation). Significant differences between the OVA group values and those of the OVA-rFljB, OVA-Plant(FljB) and OVA-Plant(Ctl) groups are indicated with asterisks. ** stands for $P \leq 0.01$ and *** for $P \leq 0.001$ using ANOVA.

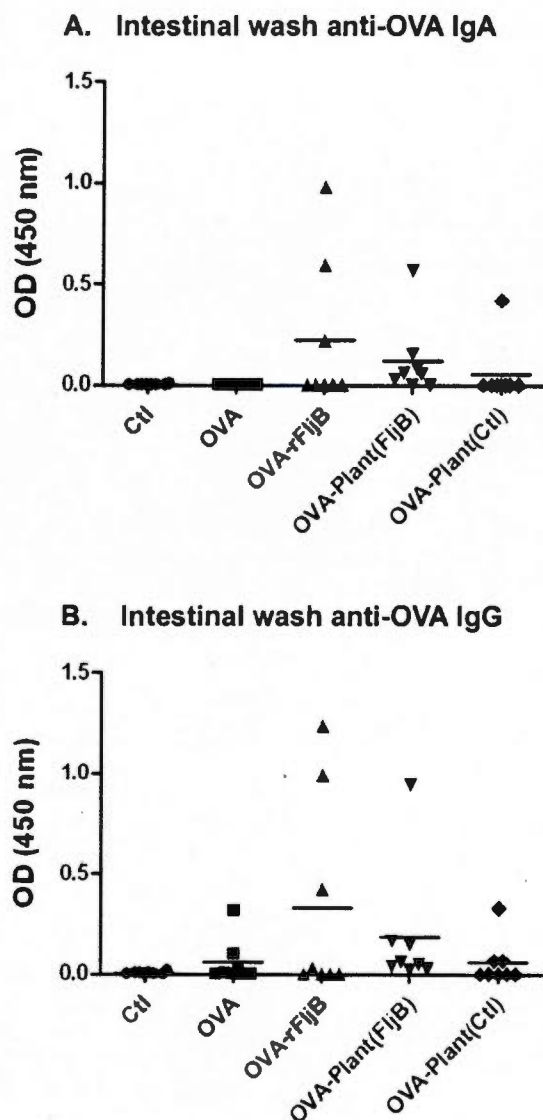


Figure 4.4: OVA-specific IgA antibodies in intestinal washes of orally immunized BALB/C mice.

ELISAs were performed using OVA as antigen and OVA-specific IgA (panel A) and IgG (panel B) antibodies were detected in intestinal washes collected from each individual mouse of experimental groups (8 mice per groups), namely Control (Ctl), OVA, OVA-rFljB, OVA-Plant(FljB) and OVA-Plant(Ctl) at day 48 PPI. Results were presented as mean OD of three independent tests for each mouse with the bar indicating the mean for each group.

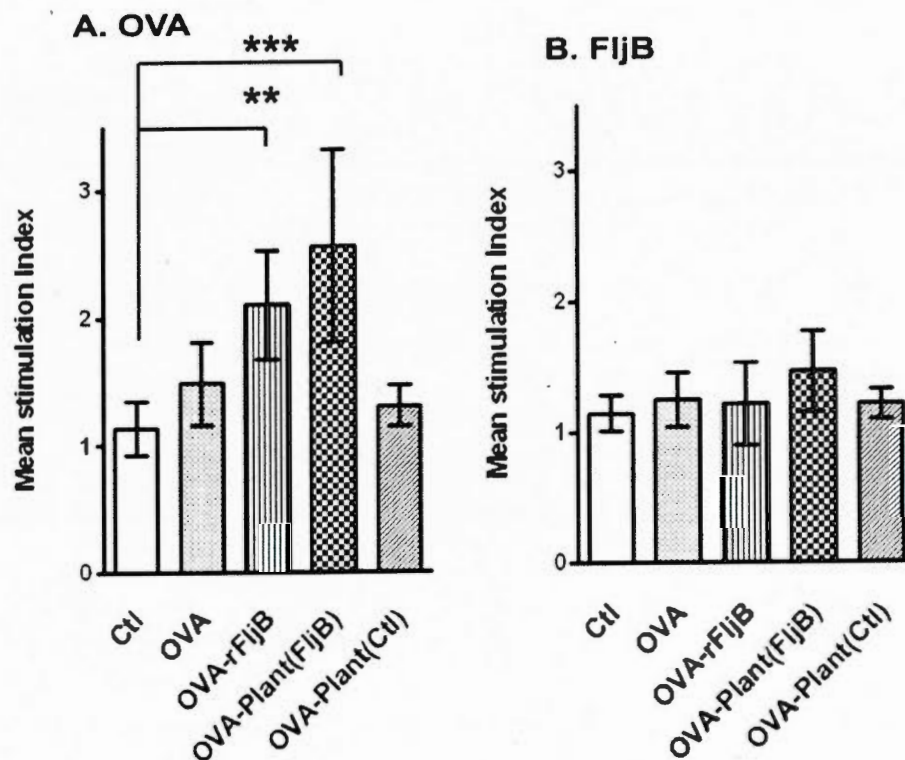


Figure 4.5: OVA- and FljB-specific spleen white cell proliferation responses of orally immunized BALB/C mice.

Quadruplicate spleen white cell cultures were stimulated with 10 $\mu\text{g/ml}$ of OVA (panel A) or 5 $\mu\text{g/ml}$ of recombinant FljB (panel B) during 96 h. Cells were labelled with radioactive H^3 -thymidine incorporated in DNA 22 h before cell harvesting. Results are expressed as stimulation index (SI) which is the ratio of mean CPM of cells stimulated with the antigen / mean CPM of cells without antigen. For each group of mice ($n=8$), namely Control (Ctl), OVA, OVA-rFljB, OVA-Plant(FljB) and OVA-Plant(Ctl), column represents the mean value of the stimulation index (\pm standard deviation). ** stands for $P \leq 0.01$ and *** for $P \leq 0.001$ using ANOVA.

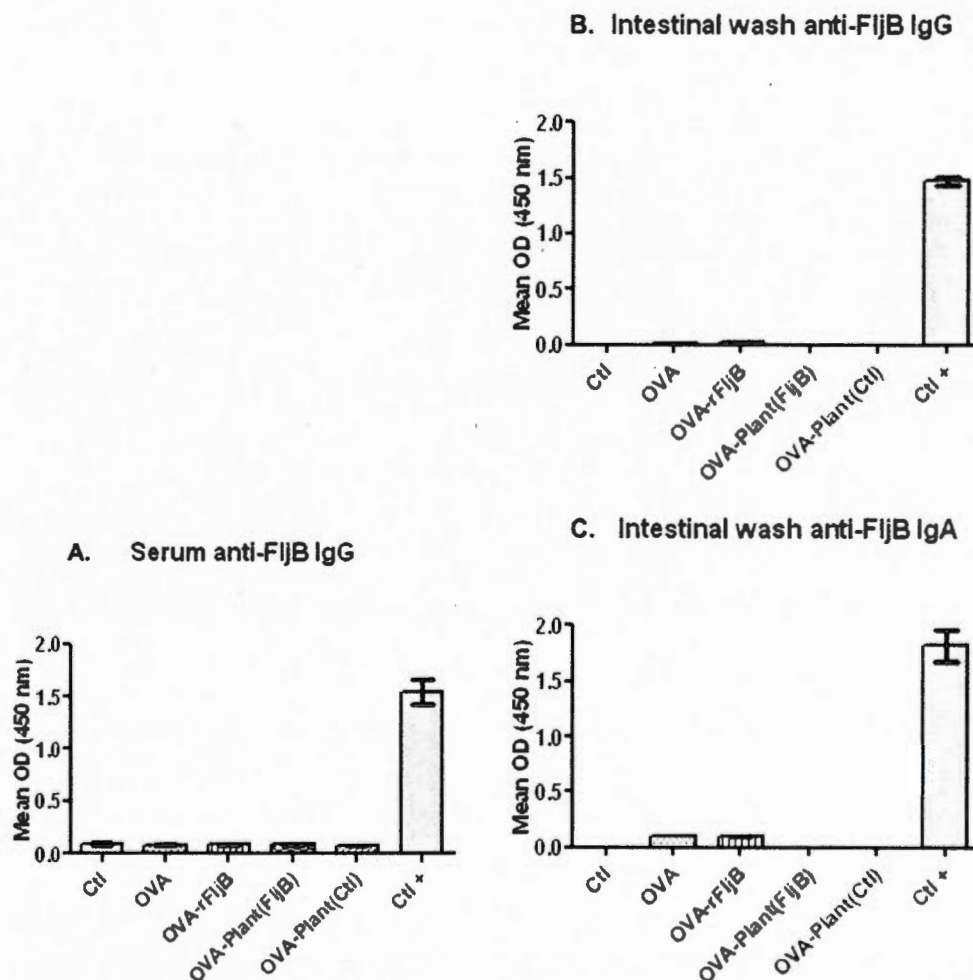


Figure 4.6: Analysis of FljB-specific serum and intestinal antibody production in orally immunized BALB/C mice.

ELISAs were performed using purified recombinant FljB as antigen and FljB-specific IgG and/or IgA antibodies were determined in sera (panel A) and intestinal washes (panels B and C) collected at day 48 PPI from each experimental group (8 mice per group), namely Control (Ctl), OVA, OVA-rFljB, OVA-Plant(FljB) and OVA-Plant(Ctl). Results are presented as mean OD of three independent tests for each group of mice (\pm standard deviation). Mean ODs are considered significant when it is equal or superior to two-fold the mean OD of negative control (Ctl) group. Serum from mice subcutaneously immunized with purified FljB expressed in plants (Bergeron-Sandoval et al., 2011) was used as positive control.

4.5 Discussion

In this study, we demonstrated, for the first time, that plants expressing FljB administrated by the oral route with a test antigen (OVA) elicits both systemic and local (mucosal) antigen-specific responses. This was measured by antibody and/or CMI responses in terms of antibody production and/or specific blastogenic stimulation of spleen lymphocytes. OVA, a 43 kDa monomeric protein, has been widely used for decades and is still employed as an immunogen model in immunization studies to evaluate antibody and CMI responses (Huleatt et al., 2007; Oliveira et al., 1998; Plebanski et al., 2010; Sun et al., 2010; Tincer et al., 2011). Recently, adjuvant activity was evaluated using OVA model by oral route delivery (Kajal et Misra, 2011; Li et al., 2011; Salman et al., 2009; Sarti et al., 2011). In most of these studies, the specific antibody response to OVA was measured using an indirect ELISA. As this test appears to detect only OVA linear epitopes (Varshney et al., 1991), it is possible that the antibody response was underestimated in our study and in others (Salman et al., 2009; Sarti et al., 2011).

Although similar antibody and CMI systemic immune response levels were observed at day 48 PPI in mice given ovalbumin and *E. coli*-expressed FljB, ovalbumin-specific antibodies were only detected at day 34 PPI in serum of these mice as compared to day 20 PPI in mice given plants expressing FljB. The difference in antibody response kinetics between these groups of mice could be explained by the immunomodulatory effect of other components present in the leaves extract such as plant lectins, known to exert adjuvant properties (Granell et al., 2010). This interpretation is supported by the fact that specific systemic antibody immune response appeared earlier in mice given ovalbumin mixed with powder from control non transformed plants (from day 34 PPI) compared to that obtained from day 41 PPI in the group of mice given ovalbumin only (Fig. 4.2). It is also possible that substances present in the freeze-dried plant cell extract protect both OVA and FljB

from digestive enzymes in the intestine and thus allow slow and constant release in the intestine for optimal immune stimulation following digestion of plant cell walls by bacteria that colonize the gut (Arlen et al., 2008; Limaye et al., 2006). In addition, chemical interactions between OVA and plant components may have occurred during mixing, resulting in OVA protection from degradation in the gut.

Early and high immune response was observed in our study in mice given plants expressing FljB and OVA when compared to groups of mice immunized with OVA alone or mixed with control plant lyophilized powder. Moreover, FljB, either expressed in plant or *E. coli*, induced Th1 and Th2 immune response as determined by the presence of anti-OVA IgG2a and IgG2b isotypes, respectively. Similar IgG isotype modulation was reported in several studies where bacterially-expressed recombinant FljB was used for mucosal immunization (Pino et al., 2005; Salman et al., 2009; Vicente-Suarez et al., 2009). Only a Th2 immune response was observed in mice given OVA only, or in mice orally treated with OVA together with control plant lyophilized powder. Similar Th2-type immune response was reported in another study when OVA was given alone or mixed with mannosylated nanoparticles (Salman et al., 2009).

Our results show that no immune response was induced against FljB following repeated oral administration. This finding is in agreement with the results of Cuadros *et al.* (Cuadros et al., 2004) but contrasts with those of Didierlaurent *et al.* (Didierlaurent et al., 2004), Huleatt *et al.* (Huleatt et al., 2007) and Bergeron-Sandoval *et al.* (Bergeron-Sandoval et al., 2011) where an immune response to flagellin was reported. In all these studies, flagellin was utilized in the context of systemic immunization. These contradictory data could be explained by the vaccine strategy used including the flagellin/FljB dose as well as the route and frequency of flagellin/FljB administration. Alternately, tolerance may have developed with the use of recombinant FljB in our study, in contrast to the *S. typhimurium* natural infection

context where a full-blown FljB-specific antibody and CMI response immune response is induced (Alaniz et al., 2006; Merrell et Falkow, 2004; Miao et al., 2007). Regardless of the above, a pre-existing FljB-specific immunity state may exist in individuals prior to immunization and thus may interfere with the adjuvant function of FljB. However this concern is limited by the fact that pre-existing immunity to flagellin did not interfere with its adjuvant function when used with several antigens such as influenza virus (Ben-Yedidia et Arnon, 1998), *Yersinia pestis* (Honko et al., 2006), or OVA (Huleatt et al., 2007). Thus, pre-existing immunity, if present, more likely would not interfere with TLR5 recognition of flagellin.

In conclusion, we demonstrated in this study that crude lyophilized powder of leaves expressing FljB exerts high adjuvant activity by simply mixing the powder with the selected antigen for oral immunization purposes. This simple protocol is of particular interest. It offers the possibility of producing large amounts of recombinant proteins such as FljB adjuvant at an affordable price and eliminates the protein purification steps that are needed for proteins produced from bacteria or eukaryotic cell expression systems (Davoodi-Semiromi et al., 2009). In addition, the transient expression system used in our study is rapid and produces large amount of stable recombinant proteins.

4.6 Acknowledgements

A. Girard and W. Saron were supported by graduate studentships from “La Fondation de l’Université du Québec à Montréal” and FARE (“Fond de l’Accessibilité à la Réussite des Étudiants de l’Université du Québec à Montréal”), respectively. This work was supported by research grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Canadian Institutes of Health Research (NSER/CIHR CHRP program) to D. Archambault and F. Sarhan. We also thank Élodie Roques for technical assistance and Andrea Gomez Corredor for helpful discussion.

CHAPITRE V

DISCUSSION

5.1 Vaccin sous-unitaire anti-rotavirus

5.1.1 Choix de la souche de rotavirus

Dans notre étude, les protéines VP4 et VP7 de la souche humaine Wa du groupe de rotavirus G1P[8] ont été sélectionnées comme modèles antigéniques pour élaborer des vaccins sous-unitaires. Ce groupe est l'un des cinq plus prévalents au niveau mondial (Santos et Hoshino, 2005; 2007). La protéine VP7 détermine le groupe G1 et VP4 le groupe P[8]. Quatre vingt dix % des souches circulantes partagent des épitopes sur VP4 et 30% sur VP7. Ces épitopes permettent une reconnaissance croisée par des anticorps neutralisants (Franco et al., 2006). Le vaccin Rotarix® (GSK) est une souche atténuée vivante appartenant au même groupe G1P[8] que la souche Wa. Ce vaccin permet d'obtenir une protection contre des souches homotypiques et hétérotypiques (Correia et al., 2010; Fischer Walker et Black, 2011). Entre 2006 et 2012, l'efficacité de ce vaccin a été estimée à environ 90 % en Europe et aux États-Unis et 80 % en Amérique Latine. Par contre, son efficacité varie de 50 % à 80 % en Afrique et en Asie (Vesikari, 2012). Les mécanismes de protection de ce vaccin ne reposent pas seulement sur les protéines VP4 et VP7 capables d'induire des anticorps neutralisants. En effet les autres protéines produites pendant une infection par les virus vivants atténués dont notamment la protéine VP6 pourraient avoir un rôle à jouer (Kirkwood, 2010). Des niveaux de protection similaires ont été obtenus avec le vaccin pentavalent Rotateq® (Merck Frosst). Avec cet autre vaccin vivant atténué, les mécanismes responsables de la protection reposent seulement sur les protéines VP4 et VP7 (Vesikari, 2012). Bien que plusieurs observations supportent l'hypothèse que le système immunitaire n'exerce pas une pression sélective suffisante contre les rotavirus pour favoriser l'apparition de sérotypes génétiquement éloignés (Franco et al., 2006; Santos et Hoshino, 2005), il serait pertinent de connaître l'impact de l'introduction de Rotarix® et Rotateq® sur la prévalence des souches existantes (Kirkwood, 2010).

Dans le chapitre II, il fut démontré que la protéine de fusion VP4Δ::VP7 permettait d'obtenir une réponse immunitaire plus forte contre le rotavirus qu'un mélange de VP4 et VP7. À la lumière des informations précédentes et de ces résultats, une suite possible à ce projet serait d'abord de sélectionner des souches n'appartenant pas au groupe G1P[8] qui sont les plus prévalentes dans certaines régions géographiques, puis de construire de nouveaux vecteurs exprimant VP4Δ::VP7 appartenant à ces souches. D'autre part, le risque d'invaginations intestinales associé aux rotavirus vivants atténués toujours présent dans l'esprit du public ainsi que les faibles taux de mortalité associés aux rotaviroses en Europe freinent l'adoption de ces vaccins dans des campagnes de vaccination obligatoires dans certains pays européens (Vesikari, 2012). Ces derniers points appuient la pertinence du développement de vaccins sous-unitaires contre le rotavirus.

5.1.2 Limites du modèle d'étude

Dans les chapitres II et III, il a été démontré que les protéines VP7, VP4, VP4Δ ou VP4Δ::VP7 et VP4Δ::VP7::FljB permettent de générer une réponse sérique en anticorps neutralisants ainsi qu'une réponse cellulaire systémique. VP4Δ::VP7 et VP4Δ::VP7::FljB administrées par voie intrarectale permettent aussi de générer une réponse en IgA spécifique au rotavirus dans l'intestin, voie d'entrée du rotavirus. Ces composantes de la réponse immunitaire appartiennent au corrélat de protection établi (Franco et al., 2006; Plotkin, 2010).

5.1.2.1 Réponse à médiation cellulaire

Beaucoup d'études portant sur le développement de vaccins contre le rotavirus se limitent à caractériser la réponse immunitaire en anticorps, notamment en anticorps neutralisants (Choi et al., 1998; Kovacs-Nolan et Mine, 2006; Li et al., 2004; Parez et

al., 2006). Pourtant l'implication de la réponse à médiation cellulaire semble importante dans la résolution d'une infection par les rotavirus d'après des études dans les modèles animaux (Franco et al., 2006; Plotkin, 2010). D'autre part, le tropisme du virus au-delà de la muqueuse intestinale est inconnu et soulève de nombreuses interrogations sur les pathologies systémiques et les séquelles qu'il pourrait causer (Blutt et Conner, 2007; Ramig, 2004). La confirmation de manifestations extra-intestinales incluant la virémie (Feng et al., 2011; Hertel et Estes, 2012) est un argument additionnel en faveur du développement d'une immunité cellulaire systémique capable d'enrayer l'infection lorsque présente dans les tissus. Dans les chapitres II et III la réponse mixte Th1/Th2 induite par les AdV exprimant les différentes protéines du rotavirus fut mise en évidence en isotypant les IgG spécifiques au rotavirus. Dans nos études, une prolifération des leucocytes de la rate a été observée suite à une stimulation avec le rotavirus humain. Il serait donc intéressant de caractériser la réponse cellulaire avec un profil de cytokines produites suite à une stimulation avec le rotavirus humain.

5.1.2.2 Expérience de défi

Bien que les résultats des chapitres II et III montrent l'immunogénicité des protéines du rotavirus choisies, une étude de protection contre les infections dans une expérience de défi aurait validé l'utilisation de la protéine VP4Δ::VP7 dans des vaccinations. Les souris ne sont pas permissives à la souche Wa du rotavirus et comme indiqué précédemment dans le tableau 1.2 seules les souches simiennes RRV et SA-11, la souche murine EDIM ainsi qu'une souche bovine ont été employées pour infecter les souris dans des expériences de défi (Choi et al., 2006b; Feng et al., 1997; Ward et al., 1990). Une équipe avait montré l'usage possible d'un modèle d'infection avec les souches humaines Wa et HAL166 chez le rat nouveau-né permettant de tester un modèle d'immunité passive et ceci dans une seule étude publiée (Ciarlet et al., 2002). Dans un premier temps, l'immunogénicité de la

construction VP4Δ::VP7 a été testée par l'administration par des AdV réplcatifs mais non disséminatifs chez trois rates adultes par voie intramusculaire. Cette étude préliminaire a montré des résultats encourageants car cette construction a permis de générer des IgG spécifiques au rotavirus mesurés dans un test ELISA indirect (résultats non montrés). En parallèle, une validation du modèle décrit précédemment fut effectuée en infectant des rats de la souche Lewis âgés de trois jours avec du rotavirus issus de culture de cellules MA104 (Ciarlet et al., 2002). Contrairement aux travaux de Ciarlet et collaborateurs, il n'a été observé ni diarrhée, ni virus infectieux dans les fèces, ni retard dans la croissance des rats pendant les 7 jours suivant l'infection effectuée par gavage (résultats non montrés). De plus, aucun ARN viral n'a été détecté par RT-PCR dans les fèces 3, 5 et 7 jours après l'infection (résultats non montrés). Cette expérience a été répétée en utilisant du rotavirus purifié sur gradient de chlorure de césium titrant à 2 Log₁₀ de plus que précédemment mais n'a pas eu plus de succès. Pour finir, une autre souche Wa ainsi que la souche hétérotypique HAL166 provenant du laboratoire du Dr. Y. Hoshino (National Health Institute, Washington, USA) ont aussi été testées sans résultats non plus. Une trop grande atténuation des souches en culture cellulaire pourrait être à l'origine de ces résultats négatifs.

Pour continuer cette étude et réaliser une expérience de défi, une alternative au modèle du rat pourrait être le modèle des porcelets gnotobiotiques développé par l'équipe du Dr. L. Saif (Ohio State University, USA) (Saif et al., 1996). Les porcelets sont permissifs à la souche Wa et développent une pathologie similaire à celle des humains (Saif et al., 1996). La physiologie du système digestif de ces animaux ressemble aussi beaucoup à celle des enfants (Saif et al., 1996). Un autre avantage de ce modèle est que les porcs sont plus permissifs aux infections par des Ad5 que les souris (Jogler et al., 2006). Des AdV non réplcatifs de ce type ont été employés pour élaborer des vaccins contre des pathogènes porcins comme notamment le virus causant le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) (Cruz et al., 2010).

Par contre, le coût des animaux et les installations nécessaires à leur hébergement représentent les inconvénients majeurs de ce modèle.

5.2 Protéines de fusion et augmentation de la réponse immunitaire

5.2.1 Expression des protéines du rotavirus

Dans la conception initiale du projet les protéines du rotavirus devaient être produites dans les plantes et exprimées par des AdV dans le but d'utiliser une stratégie vectorielle combinatoire AdV/plante pour immuniser les souris. Il avait été choisi de produire les mêmes antigènes dans les plantes ainsi qu'avec les AdV. La fusion des trois protéines VP7, VP4 et FljB nécessitait de générer un gène chimérique de grande taille. Dans le but de favoriser le clonage dans le vecteur plasmidique d'expression dans les plantes, la protéine VP4 a été tronquée (Bergeron-Sandoval et al., 2011). La protéine VP4 Δ contient les trois épitopes neutralisants majeurs de la partie VP8* de VP4 ainsi que d'autres épitopes neutralisants et le site de liaison permettant l'entrée du rotavirus dans les cellules situés sur la partie VP5* de VP4. Lorsque VP4 Δ ::VP7 et VP4 Δ ::VP7::FljB ont été exprimées dans des cellules A549, 293A ou des macrophages J774A.1 infectés par des AdV, un clivage spontané de VP4 Δ a été observé. Ce clivage n'a pas été observé lors de l'expression de VP4 Δ ::VP7::FljB dans les plantes (résultats non montrés). Il est possible que ce clivage ait aussi lieu *in vivo* chez les souris vaccinées. Le chapitre II a montré que la protéine de fusion VP4 Δ ::VP7 a des effets synergiques sur la réponse immunitaire spécifique au rotavirus. De tels effets synergiques ont été observés en fusionnant deux fois la même protéine ou bien en fusionnant des protéines différentes (Theisen et al., 2004; Wei et al., 2011). Ces résultats amènent plusieurs questions sur la nécessité de la fusion de ces protéines. En effet, il se pourrait que les effets synergiques soient dus à la fusion de la protéine ou bien à la co-expression des deux protéines VP4 Δ et VP7 dans une même cellule. Pour vérifier ce point il faudrait construire un AdV qui exprime les deux protéines non fusionnées en insérant les séquences codant pour les deux protéines sous le contrôle d'un même promoteur mais en plaçant un IRES entre les deux séquences. Une stratégie similaire a été appliquée avec les protéines M et

GP5 du virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin (SRRP) et des AdV non réplicatifs (Zheng et al., 2007).

Comme mentionné précédemment les mêmes constructions antigéniques ont été produites en parallèle et exprimées dans des feuilles de tabac transgénique (Bergeron-Sandoval et al., 2011). Pour des raisons techniques, notamment des faibles rendements de production et une faible immunogénicité des protéines du rotavirus chez la souris (Bergeron-Sandoval et al., 2011), cet objectif n'a pas pu être poursuivi. L'effet synergique de la fusion de VP4 Δ et VP7 n'a pas pu être testé dans un autre modèle de vaccin sous-unitaire.

5.2.2 Expression de FljB en fusion ou seule

La flagelline a été choisie pour ses capacités adjuvantes démontrées lorsqu'en fusion ou en mélange avec des antigènes (Honko et al., 2006; Huleatt et al., 2007; Mizel et Bates, 2010; Salman et al., 2009; Song et al., 2009; Taylor et al., 2011). La flagelline a été fusionnée en position soit N-terminale (Cuadros et al., 2004; Delaney et al., 2010; Schulke et al., 2011) soit C-terminale (Bates et al., 2011; Xu et al., 2011) de l'antigène. Aucune étude n'a comparé une position par rapport à l'autre. Il est suggéré que la fusion d'un antigène avec la flagelline peut modifier la conformation de celui-ci mais cela dépend toujours de l'antigène lui-même (Mizel et Bates, 2010). De plus, quelques études rapportent que de plus forts effets adjuvants sont obtenus grâce à la fusion avec l'immunogène (Bates et al., 2011; Delaney et al., 2010; Schulke et al., 2011; Xu et al., 2011). Une meilleure activation des cellules présentatrices des antigènes serait à l'origine de ce phénomène (Mizel et Bates, 2010). Compte tenu que le site d'activation de l'inflammasome se retrouve dans les 35 acides aminés en position C-terminale (Lightfield et al., 2008), nous avons choisi de fusionner FljB en position C-terminale de VP4 Δ ::VP7. Un effet adjuvant dû à cette fusion a ainsi été démontré dans le chapitre III.

Dans le chapitre IV, FljB a généré un effet adjuvant lorsque produite seule dans les plantes puis mélangée à l'ovalbumine (OVA). Dans ce même chapitre ainsi que dans une étude antérieure (Bergeron-Sandoval et al., 2011), il a été montré que l'expression de FljB dans les feuilles de *N. benthamiana* n'avait pas induit d'effet toxique dans les tissus de la plante. À l'opposé, Takakura et collaborateurs ont observé l'apparition de zones décolorées et nécrosées sur les feuilles d'un riz transgénique exprimant FljB (Takakura et al., 2008). Les flagellines sont connues pour induire un mécanisme de défense chez la plante pouvant conduire à la mort des cellules végétales (Chinchilla et al., 2006; Gomez-Gomez et Boller, 2002). La différence entre notre étude et celle réalisée dans le riz peut être expliquée par l'utilisation d'un système d'expression différent. En effet, Takakura et ses collaborateurs ont employé un système d'expression stable et continue alors qu'un système d'expression transitoire, avec lequel la production de FljB ne dure que 7 jours, avait été choisi dans nos études.

Dans les chapitres III et IV, FljB a été produite dans des systèmes eucaryotes d'expression. FljB est une protéine non glycosylée (Yonekura et al., 2003; Yonekura et al., 2005) mais plusieurs sites de O-glycosylations ont été prédits avec les serveurs NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) et NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) (Hansen et al., 1998). Contrairement à *E. coli* ou *S. typhimurium*, les cellules de plantes ou de mammifères peuvent produire des modifications post-traductionnelles (N- et O-glycosylations par exemple) lors de la maturation des protéines. En changeant de système d'expression (eucaryote au lieu de procaryote) des modifications ont pu être introduites dans la structure de FljB recombinante dans nos études. Il est possible que l'ajout de telles glycosylations ait interféré avec la reconnaissance de FljB par les PRR. Concernant cette hypothèse, des données contradictoires ont été obtenues. D'un côté il a été montré que la flagelline de *Campylobacter jejuni* [bactérie Gram-négative qui fait partie des quelques

exceptions parmi les *Bacteria* et *Archaea* capables d'ajouter des glycosylations (Abu-Qarn et al., 2008)] possède des O-glycosylations (Szymanski et al., 2003) et celles-ci n'interfèrent pas avec la reconnaissance de cette flagelline avec le TLR5 (de Zoete et al., 2010). Dans le chapitre IV, les résultats avec les plantes exprimant FljB comme adjuvant semblent aller dans ce sens puisqu'ils sont comparables à ceux obtenus avec FljB produite chez *E. coli*. À l'opposé, Applequist et ses collaborateurs ont montré dans une étude chez la souris qu'une protéine FliC mutée pour certains sites de N-glycosylation et exprimée dans des cellules de mammifères avec un plasmide avait de meilleures capacités adjuvantes (Applequist et al., 2005). Il serait donc intéressant d'évaluer si des glycosylations potentielles de FljB administrée par les AdV n'affectent pas les capacités adjuvantes de cette protéine.

5.3 Les différentes voies d'administration

5.3.1 La compartimentalisation de la réponse immunitaire en fonction des voies d'administration d'un antigène

Chez l'homme, la majorité des vaccins commerciaux sont administrés par des injections intramusculaires (Plotkin, 2005). De nombreuses études ont démontré que de telles injections pouvaient induire une réponse immunitaire non seulement au niveau systémique mais aussi au niveau des muqueuses qui sont le point d'entrée de la majorité des pathogènes (Belyakov et Ahlers, 2009; Haan et al., 2001; Lin et al., 2007; Neutra et Kozlowski, 2006). Cependant d'autres études ont montré que l'induction d'une réponse immunitaire au niveau des muqueuses est plus forte lorsqu'induite par une administration locale (Belyakov et Ahlers, 2009; Mason et al., 2008; Neutra et Kozlowski, 2006; Silin et al., 2007). La compartimentalisation des réponses immunitaires est responsable de ce phénomène (Czerkinsky et Holmgren, 2012). Le site où l'antigène est rencontré par les lymphocytes est primordial pour déterminer la migration de ceux-ci vers un territoire tissulaire particulier (phénomène appelé écotaxie). Ce mécanisme est contrôlé par l'expression de récepteurs et d'intégrines à la surface des lymphocytes (Kunkel et al., 2003; Salmi et Jalkanen, 2005). Le tropisme intestinal des lymphocytes est déterminé par l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ qui est induite si les lymphocytes ont rencontré un antigène dans un organe lymphoïde secondaire associé à l'intestin. Cette intégrine se lie à MAdCAM-1 (adressine vasculaire des muqueuses 1) à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins de la muqueuse intestinale (Salmi et Jalkanen, 2005). L'épithélium intestinal produit des chimiokines CCL25 ou CCL28 pour attirer les lymphocytes sensibilisés dans l'intestin. Ceux-ci portent respectivement des récepteurs CCR9 ou CCR10. Des récepteurs et intégrines différents sont produits si les lymphocytes sont sensibilisés dans des organes lymphoïdes non reliés aux muqueuses. Le récepteur CCR9 est associé à l'écotaxie du petit intestin mais des

plasmocytes sécréteurs d'IgA portant le CCR10 sont retrouvés dans toutes les muqueuses (Kunkel et al., 2003). D'autre part, des virus peuvent modifier l'écotaxie des lymphocytes. En effet, des immunisations intramusculaires répétées avec des AdV ont montré que la fonctionnalité des lymphocytes T cytotoxiques augmentait ainsi que leur écotaxie intestinale grâce à l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ (Ganguly et al., 2011; Lin et al., 2007; Tatsis et al., 2007). Le choix d'une voie d'administration d'un vaccin s'avère donc importante pour cibler les tissus où la réponse immunitaire doit être induite de manière optimale.

5.3.2 La voie intramusculaire

Générer des anticorps neutralisant le rotavirus au niveau intestinal est crucial pour obtenir une réponse protectrice contre une infection chez l'homme (Dennehy, 2008; Franco et al., 2006; Plotkin, 2010). Cependant, l'emploi de la voie d'administration intramusculaire peut résulter en une certaine protection contre des infections chez les animaux. C'est le cas par exemple de rotavirus inactivés (Jiang et al., 2008; Johansen et al., 2003) et d'AdV exprimant VP4 (Liu et al., 2005). Plusieurs études ont proposé que les anticorps sériques sont le mécanisme à l'origine de cette protection (Jiang et al., 2002). D'autre part, des injections d'AdV chez la souris par voie intramusculaire ne permettent pas de produire des sIgA spécifiques à un antigène du VIH dans la salive, les fèces et les sécrétions vaginales (Lemiale et al., 2003). La compartimentalisation de la réponse immunitaire demeure un paramètre important dans le choix de la voie d'administration d'un vaccin.

La voie intramusculaire a été employée dans le chapitre II pour pouvoir comparer l'immunogénicité des différentes protéines du rotavirus (VP4, VP4 Δ , VP7 et VP4 Δ ::VP7) chez la souris et éviter une tolérance possible des muqueuses qui aurait pu diminuer les niveaux de réponses immunitaires. Il a aussi été montré que de forts niveaux d'anticorps sériques obtenus après des immunisations systémiques

pouvaient induire une protection contre les rotavirus (Jiang et al., 2008). Une expérience de défi serait nécessaire pour évaluer les niveaux de protection engendrés dans notre étude. Le meilleur immunogène est la protéine VP4Δ::VP7 lorsqu'administrée par voie intrasuculaire (chapitre II). Cette protéine a ensuite été fusionnée à un adjuvant (FljB) et testée dans des immunisations mucosales 9chapitre III). Dans le chapitre II, la protéine VP4Δ::VP7 a été administrée avec un régime de vecteurs différents (AdV/plasmide). Dans le chapitre III, les souris ont exprimé cette protéine grâce à deux injections d'AdV. Dans ces deux études, les niveaux d'IgG sériques spécifiques au rotavirus ont été analysés de manière préliminaire grâce à un test ELISA indirect pour comparer les groupes de souris immunisée avec VP4Δ::VP7 (résultats non montrés). Même si ce test a été effectué avec un mélange constitué de tous les sérums de souris issus d'un même groupe, les résultats indiquent que les deux procédures d'immunisation ont conduit à un niveau similaire d'IgG sériques spécifiques au rotavirus. Des tests supplémentaires sur les sérums issus de souris individuelles ainsi qu'un test de neutralisation virale effectué avec la même technique seraient nécessaires pour conclure que la voie d'administration intrarectale des AdV permet d'induire une réponse en anticorps et une réponse cellulaire similaires à une administration intramusculaire de la combinaison vectorielle AdV/plasmide.

5.3.3 La voie orale

5.3.3.1 Avantages et inconvénients de la voie orale en vaccination

La voie orale, employée pour l'administration de la grande majorité des médicaments, semble être toute indiquée pour vacciner. Son utilisation permet d'éviter le recours à des injections parentérales et tous les inconvénients liés à l'emploi d'aiguilles (douleur, contamination possible par d'autres pathogènes...). Cependant, même si elle est très pratique, la voie orale demeure la plus difficile pour stimuler le système immunitaire et engendrer des réponses immunitaires efficaces. La dilution de la préparation antigénique dans le bol alimentaire ainsi que sa possible

dégradation par les enzymes digestives ou par les grandes variations de pH dans le tube digestif en sont des causes possibles (Lugade et al., 2010; Plotkin, 2009; Silin et al., 2007).

La tolérance orale, mécanisme mis en place dans l'intestin grêle par le système immunitaire adaptatif, est un autre obstacle possible à l'utilisation de la voie orale en vaccination (Mason et al., 2008; Simon et Kotloff, 2010). Le système immunitaire intestinal permet de maintenir un équilibre entre l'immunité protectrice et l'homéostasie lorsque confronté à une flore commensale et à un grand nombre d'antigènes étrangers qui pour la plupart ne sont pas issus d'organismes pathogènes (Mason et al., 2008; Simon et Kotloff, 2010). Des cellules T régulatrices CD4+ sécrétrices de TGF- β (pour «transforming Growth Factor- β »), appelées cellules Th3, paraissent jouer un rôle déterminant dans la tolérance orale (Mowat, 2003; Mowat et al., 2004; Weiner et al., 2011). Une étude chez la souris dans laquelle l'OVA a été employée comme antigène a aussi montré un rôle des cellules T régulatrices CD4+ CD25+ dans l'induction de la tolérance immunitaire (Thorstenson et Khoruts, 2001). Ainsi, lorsqu'un antigène inoffensif intrinsèquement est introduit par voie orale, il induit une réponse immunitaire au niveau systémique plus faible que lorsqu'il est injecté parentéralement (Mowat, 2003; Mowat et al., 2004). Cet effet a pu être mesuré en terme de production d'IgG spécifiques dans une étude chez des souris BALB/c utilisant l'OVA (Dearman et al., 2001). Une inhibition de la prolifération des lymphocytes de la rate a été observée après une stimulation *in vitro* avec l'OVA (Oliveira et al., 2002). Enfin, après avoir induit une tolérance orale, des injections systémiques du même antigène n'augmentent pas ou peu la réponse immunitaire spécifique à cet antigène (Mowat, 2003; Mowat et al., 2004; Thorstenson et Khoruts, 2001). Une suppression similaire des réponses immunitaires subséquentes est observée après l'administration de protéines inertes au niveau d'autres muqueuses (Mascarell et al., 2011).

5.3.3.2 Utilisation de la voie orale en vaccination contre le rotavirus

Les protéines de structure lorsqu'assemblées dans les particules de rotavirus sont reconnues pour leur résistance dans le tube digestif (Pesavento et al., 2006). Les variations de pH et l'action de la trypsine sont même nécessaires pour changer la conformation de VP4 et permettre l'entrée du virus dans les entérocytes (Crawford et al., 2001; Dormitzer et al., 2004). Cependant, les rotavirus inactivés ou bien les VLPs, qui ne peuvent ni infecter ni se répliquer dans les entérocytes, sont peu efficaces pour générer une réponse protectrice par voie orale en comparaison avec les rotavirus atténués vivants (El-Attar et al., 2009; Franco et al., 2006; Iosef et al., 2002; Jiang et al., 2008). Certaines protéines recombinantes purifiées du rotavirus employées dans des immunisations par voie orale ont permis de générer différents niveaux de protection contre une infection par des rotavirus (souches murines ou simiennes) chez la souris. Il s'agit de la protéine VP6 en mélange avec des adjuvants (Choi et al., 2002) et de NSP4 fusionnée à des toxines (Choi et al., 2005a; Choi et al., 2006b). Plusieurs plantes transgéniques ont été générées pour exprimer des protéines du rotavirus de souches simiennes, bovines et murines. Ainsi un peptide de VP4 (Wigdorovitz et al., 2004) ou VP8* (Lentz et al., 2011; Perez Filgueira et al., 2004) ou encore VP6 (Dong et al., 2005; Zhou et al., 2010a) ont été produits dans des plantes et administrés par voie orale ce qui a permis de conférer une protection partielle contre le rotavirus dans des modèles d'infection chez la souris.

Il était initialement prévu de tester les protéines chimériques VP4 Δ ::VP7 et VP4 Δ ::VP7::FljB exprimées dans des plantes dans des immunisations par voie orale. Même si ces travaux n'ont pas abouti, les résultats obtenus avec les plantes exprimant FljB seule laisse entrevoir des applications possibles pour vacciner contre le rotavirus. En effet, l'usage de cet adjuvant pourrait augmenter et moduler la réponse contre le rotavirus inactivé administré par voie orale. Le rotavirus inactivé est connu pour

n'induire qu'une faible réponse Th2 (Jiang et al., 2008). Cet adjuvant permettrait de développer des vaccins plus sûrs que des pathogènes vivants atténués.

5.3.3.3 Tolérance orale et OVA

Dans l'étude présentée dans le chapitre IV, l'OVA a été administrée en mélange avec FljB ou seule par voie orale dans le but d'évaluer la capacité adjuvante de cette dernière protéine. Après six gavages avec l'OVA seule effectués tous les sept jours, la réponse immunitaire contre l'OVA était globalement plus faible que lorsque l'OVA était mélangée à FljB. D'autres études ont montré chez la souris que seulement deux gavages (espacés de 7 jours) avec de l'OVA seule peuvent induire une tolérance orale à cette protéine (Oliveira et al., 2002; Oliveira et al., 1998). Quand ils ont comparé un groupe de souris immunisées avec l'OVA seule par voie orale avec un autre groupe de souris immunisées par voie intra-péritonéale, ils ont observé une diminution de la réponse en anticorps sériques et n'ont pas relevé de prolifération spécifique à l'OVA des lymphocytes de la rate (Oliveira et al., 2002). En utilisant la même technique que dans cette étude, nous n'avons pas non plus mesuré de prolifération spécifique à l'OVA des lymphocytes de la rate des souris immunisées par voie orale avec l'OVA seule ou mélangée avec des extraits de plantes n'exprimant pas FljB.

La réduction de la réponse en anticorps par l'induction d'une tolérance orale à l'OVA aurait pu être montrée en ajoutant un groupe de souris immunisée parentéralement avec l'OVA seule. Il serait aussi pertinent de voir l'effet de l'adjuvant sur une possible tolérance orale contre l'OVA en évaluant si le mélange avec l'adjuvant administré par voie orale permet d'obtenir une réponse équivalente ou plus forte à celle obtenue avec des immunisations parentérales. En effet, Oliveira et collaborateurs ont montré que l'induction de la tolérance orale à l'OVA était contrée en liant de manière covalente ou non l'OVA à un adjuvant lipidique et en les

administrant par voie parentérale (Oliveira et al., 2002; Oliveira et al., 1998). De plus, ils ont démontré que l'emploi d'un adjuvant augmente la réponse en anticorps spécifiques à l'OVA et la prolifération des lymphocytes de la rate des souris en présence d'OVA (Oliveira et al., 2002).

Deux études ont employé les flagellines de *S. typhimurium* comme adjuvant par voie orale (Cookson et Bevan, 1997; Salman et al., 2009) sans toutefois analyser l'effet de l'usage des flagellines sur la tolérance orale. De manière intéressante, Salman et collaborateurs ont immunisé des souris avec l'OVA en présence ou non de la flagelline par voie orale. D'autres groupes de souris ont reçu ces mêmes préparations à l'aide d'injections sous-cutanées (Salman et al., 2009). Ils se sont limités à évaluer la réponse en IgA spécifiques à l'OVA dans les fèces confirmant que des immunisations par voie orale génèrent une réponse plus forte au niveau intestinal que des immunisations parentérales (Belyakov et Ahlers, 2009; Mason et al., 2008; Neutra et Kozlowski, 2006; Silin et al., 2007). Par contre, ils ne montrent pas les niveaux d'IgG ou d'IgA spécifiques à l'OVA dans le sérum, ce qui aurait permis de voir si l'ajout de flagelline peut contourner la tolérance orale en générant autant ou plus d'anticorps contre l'OVA qu'une immunisation sous-cutanée avec de l'OVA seule.

5.3.3.4 Tolérance des muqueuses et FljB

Dans le chapitre IV, aucune réponse immunitaire contre FljB n'a été détectée lorsqu'administrée en mélange avec l'OVA. FljB avait été produite avec deux systèmes différents, soit non purifiée dans des feuilles de tabac transgénique soit produite et purifiée à partir d'*E. coli*. Dans cette étude, six immunisations avec une dose contenant 10 µg de FljB (produite dans l'un ou l'autre des systèmes) ont été effectuées par gavage. Dans l'étude de Bergeron-Sandoval et collaborateurs, les extraits protéiques issus de feuilles de tabac ont été administrés par voie sous-cutanée

et contenait 15.99 µg de VP7::FljB, 6.13 µg de VP4Δ::FljB ou bien 2.03 µg de FljB (Bergeron-Sandoval et al., 2011). Une réponse détectable en IgG dans le sérum a été générée avec moins d'injections et des doses de FljB à peine supérieures ou inférieures à celle employée dans le chapitre IV. D'autres études utilisant FliC ou FljB par voie systémique ont montré l'immunogénicité de celles-ci (Didierlaurent et al., 2004; Huleatt et al., 2007). Il se peut donc qu'une tolérance orale à FljB ait été induite par l'administration par voie orale dans notre étude du chapitre IV. Pour vérifier cette hypothèse un groupe de souris immunisées par voie parentérale avec 10 µg de FljB (protéine recombinante purifiée) et à la même fréquence que les groupes immunisés oralement aurait été nécessaire. Si cette hypothèse s'avérait vérifiée, il faudrait ensuite étudier si l'induction d'une tolérance orale à FljB ne serait pas un obstacle à la réutilisation de celle-ci dans des vaccinations subséquentes par la même voie ou bien par une autre. Il faudrait donc vérifier si une tolérance immunitaire ne nuit pas à sa reconnaissance par l'immunité innée. Il serait envisageable de clarifier ce point dans notre étude en vérifiant par exemple s'il est bien pertinent d'utiliser FljB lors des six gavages.

Bien que peu d'informations soient connues sur la tolérance immunitaire au niveau de la muqueuse du côlon, une flore commensale y réside ce qui suggère qu'une tolérance à des antigènes pourrait aussi être induite à ce niveau. Les résultats du chapitre III montrent cependant qu'une réponse adaptative contre FljB a été générée aux niveaux systémique et intestinal chez les souris immunisées par voie intrarectale avec des AdV réplicatifs et non disséminatifs exprimant VP4Δ::VP7::FljB. Des études utilisant des injections systémiques de FljB fusionnée ou non à d'autres antigènes (Bergeron-Sandoval et al., 2011; Didierlaurent et al., 2004; Huleatt et al., 2007) avaient auparavant montré de telles réponses immunitaires contre FljB. Dans le chapitre III, le mode d'administration de FljB est intracellulaire dans le contexte d'une infection par des AdV alors que dans le chapitre IV, où il n'y a aucune réponse générée contre FljB, celle-ci étant administrée sous forme de

protéines recombinantes et se retrouvant donc dans le milieu extracellulaire. Cette différence dans le mode d'administration entre les études des chapitres III et IV pourrait expliquer pourquoi une réponse spécifique à FljB est générée par voie intrarectale et ne l'est pas par voie orale.

Enfin à la vue des résultats du chapitre III, il est possible que l'immunité générée contre FljB nuise à ses fonctions adjuvantes dans des immunisations subséquentes par la même voie ou par une autre. Cependant d'autres études ont montré qu'une immunité pré-existante en anticorps n'interférerait pas aux fonctions adjuvantes de FljB dans des immunisations subséquentes par voie intranasale ou bien par voie systémique (Ben-Yedidia et Arnon, 1998; Honko et al., 2006).

En conclusion, la voie orale est la plus difficile pour vacciner de manière efficace. Les antigènes ou bien les adjuvants administrés par cette voie peuvent non seulement être dégradés dans le tractus digestif mais aussi induire une tolérance immunitaire. De nouveaux adjuvants qui peuvent augmenter et moduler la réponse immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale tels que les plantes exprimant FljB seront d'une grande utilité dans le domaine de la vaccinologie.

5.3.4 Les voies mucosales alternatives à la voie orale

La tolérance orale, la dilution des antigènes dans le bol alimentaire et la dégradation de ceux-ci sont des obstacles majeurs à l'élaboration de vaccins oraux (Lugade et al., 2010; Mason et al., 2008; Plotkin, 2009; Silin et al., 2007; Simon et Kotloff, 2010). Développer des vaccins sous-unitaires contre des pathogènes infectant la muqueuse intestinale est un défi et d'un grand intérêt pour la recherche en vaccinologie (Belyakov et Ahlers, 2009; Brandtzaeg, 2007; Plotkin, 2005). Bien qu'une tolérance immunitaire puisse être induite par des administrations au niveau de différentes muqueuses (Mascarell et al., 2011), d'autres voies mucosales ont été

employées et ont permis d'obtenir de meilleurs résultats que la voie orale pour induire une réponse immunitaire contre des vaccins sous-unitaires (Brandtzaeg, 2007). Ce phénomène est une caractéristique du système immunitaire commun aux muqueuses qui permet de vacciner à un site mucosal différent de celui que l'on veut protéger (Czerkinsky et Holmgren, 2012; Williams, 2004).

Dans le cadre de vaccins anti-rotavirus, la voie intranasale a été comparée à la voie orale. Son efficacité à générer une meilleure immunité protectrice a été montrée avec des protéines recombinantes (Choi et al., 2004; McNeal et al., 2006), des VLP (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003; Blutt et al., 2006b; O'Neal et al., 1997) et des AdV (Liu et al., 2005). Dans cette dernière étude, une réponse protectrice plus faible est générée avec l'emploi de la voie orale qu'avec la voie intramusculaire et intranasale (Liu et al., 2005). Dans ce cas, même si la tolérance orale ne peut pas être écartée, le pH gastrique inactivant l'infectivité des AdV pourrait être la cause de ce résultat (Cheng et al., 2003). Cependant il faut souligner que dans ces études des adjuvants ou bien des vecteurs viraux ont été employés pour administrer les antigènes d'intérêt au niveau de ces autres muqueuses.

5.3.4.1 La voie intrarectale

La voie intrarectale fut une alternative à la voie orale pour l'administration de VP6 recombinante (McNeal et al., 2007). L'administration par cette voie de VLP mélangées avec un adjuvant a conféré une protection dans un modèle d'infection de souris (Agnello et al., 2006; Parez et al., 2006; Soler et al., 2007). Comparativement à la voie intranasale, la voie rectale permet de produire une réponse plus grande dans le petit intestin pour l'administration de VLP (Agnello et al., 2006). Les résultats présentés dans le chapitre III montrent que des AdV réplicatifs, non disséminatifs exprimant les protéines VP4 Δ ::VP7 et VP4 Δ ::VP7::FljB et administrés par voie rectale permettent de générer une réponse spécifique au rotavirus humain au niveau

systémique et au niveau du petit intestin. Ces résultats appuyés par d'autres études montrent la faisabilité d'employer la voie intrarectale pour des vaccinations contre le rotavirus.

5.3.4.2 Induction d'une réponse immunitaire dans le côlon

Dans l'étude présentée dans le chapitre III, les AdV réplicatifs, non disséminatifs ont permis de générer une réponse immunitaire contre le rotavirus au niveau systémique et au niveau du petit intestin en infectant d'abord la muqueuse colorectale. Bien que très documentée dans le petit intestin, l'induction d'une réponse immunitaire contre un agent pathogène l'est peu dans le côlon (Macdonald et Monteleone, 2005). La muqueuse colorectale des souris, ovins, bovins, porcins et humains possède de nombreux follicules lymphoïdes ressemblant beaucoup à la structure des plaques de Peyer du petit intestin (Sedgmen et al., 2004). Des analyses en microscopie électronique ont révélé que des cellules M de l'épithélium étaient associées à ces follicules (Sedgmen et al., 2004). Ces observations suggèrent que ces structures pourraient être à l'origine de l'induction d'une réponse immunitaire dans le côlon. Zhu et collaborateurs ont démontré chez la souris que des AdV non réplicatifs administrés par voie intrarectale peuvent infecter et exprimer leur transgène non seulement dans les cellules épithéliales de la muqueuse colorectale mais aussi dans les cellules épithéliales du caecum et de l'iléon du petit intestin (Zhu et al., 2008). Ces observations avec d'autres modèles antigéniques pourraient expliquer pourquoi les AdV employés dans le chapitre III ont permis de générer une réponse immunitaire spécifique au rotavirus dans le petit intestin. Dans cette autre étude, les AdV ont aussi infecté des cellules dendritiques retrouvées dans la lamina propria et dans les ganglions iliaques (Zhu et al., 2008). Ils ont aussi montré que ces cellules dendritiques pouvaient migrer de la lamina propria vers les ganglions iliaques où elles sont capables d'initier une réponse à médiation cellulaire et une réponse en anticorps au niveau de la muqueuse colorectale (Zhu et al., 2008). Une autre étude portant sur

des essais de vaccination contre le VIH chez le singe utilisant des AdV réplicatifs et disséminatifs a démontré que ces vecteurs infectaient des cellules dendritiques et des macrophages se retrouvant dans la muqueuse rectale et ceci qu'ils soient administrés par voie intranasale ou intrarectale (Patterson et al., 2012). Ainsi, des AdV disséminatifs peuvent se retrouver dans différentes muqueuses et peuvent potentiellement induire une réponse immunitaire dans différents compartiments mucosaux. Immuniser par voie intrarectale permet de produire des cellules B effectrices capables de migrer dans la muqueuse intestinale (Di Martino et al., 2007; Kantele et al., 1998; Quiding-Jarbrink et al., 1997). Chez l'homme, des immunisations intrarectales lorsque comparées avec des immunisations orales n'ont pas induit de différences au niveau de l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ des plasmocytes spécifiques à l'antigène administré (Kantele et al., 1998; Quiding-Jarbrink et al., 1997). Ceci se traduit aussi en une réponse équivalente en anticorps dans les sécrétions intestinales et dans le sérum (Kantele et al., 1998).

5.3.4.3 Voie intrarectale et utilisation des AdV

Comme discuté dans le paragraphe précédent les AdV apparaissent comme des vecteurs efficaces pour acheminer des antigènes par voie intrarectale. Cependant l'emploi des AdV dans des immunisations répétées peut être limité par la génération d'anticorps neutralisant ces vecteurs (Lasaro et Ertl, 2009; Russell, 2009; Tatsis et Ertl, 2004). Dans le chapitre II, une stratégie vectorielle combinatoire AdV/plasmide a permis de générer une meilleure réponse contre VP4 Δ que des immunisations avec des AdV seuls. Cette stratégie combinatoire a aussi permis de générer moins d'anticorps neutralisants dirigés contre les AdV dans le sérum des souris en utilisant un test *in vitro* de neutralisation virale (résultats non montrés). Après deux immunisations, les titres d'anticorps neutralisant les AdV obtenus étaient 100 fois inférieurs à ceux obtenus par l'administration des AdV seuls.

La voie intranasale limite les effets d'une immunité pré-existante spécifique aux AdV (Croyle et al., 2008; Richardson et al., 2011) en limitant possiblement la quantité d'anticorps neutralisant les AdV générés (Barouch et al., 2011; Mast et al., 2010). Les voies mucosales semblent représenter une bonne stratégie pour optimiser l'emploi des AdV. C'est pourquoi, avant de réaliser l'étude du chapitre III, une étude préliminaire avait été menée pour comparer la voie intrarectale à la voie intramusculaire en terme de niveaux d'anticorps sériques pouvant neutraliser les AdV *in vitro* (Fig. A1). Dans cette étude deux injections d'AdV exprimant la GFP (10^8 TCID₅₀ par injection) ont été réalisées au jour 0 et au jour 21. Les souris ont été sacrifiées au jour 42. Cette cédule est identique à celle appliquée dans le chapitre III. Dans cette étude, les AdV réplicatifs, non disséminatifs sont aussi comparés à des AdV non réplicatifs. L'utilisation de la voie intrarectale diminue très significativement (d'environ 32 fois) les titres en anticorps neutralisants par rapport à la voie intramusculaire. Par contre, la réplication des AdV n'a eu aucun impact sur les titres en anticorps neutralisants. Une des explications à ces observations pourrait être la présence de particules défectives dans les préparations d'AdV. Comme ces particules sont incapables d'infecter les cellules épithéliales, il est possible qu'elles se retrouvent uniquement exposées au système immunitaire lorsqu'injectées par voie intramusculaire. Elles ne le sont majoritairement pas dans le cas d'une injection intrarectale où ces particules restent dans la lumière intestinale et sont évacuées dans les fèces. Les AdV réplicatifs et non disséminatifs ainsi que les AdV non réplicatifs employés dans notre étude avaient environ le même ratio de particules défectives soit environ 1 particule défective pour 20 particules infectieuses (résultats non montrés). Ce point pourrait expliquer pourquoi ces deux systèmes induisent la même quantité d'anticorps sériques neutralisant les AdV alors que la réplication permet de produire plus d'antigènes (protéine d'intérêt et protéines de l'AdV) dans la cellule infectée.

En conclusion, des immunisations par voie intrarectale semblent efficaces pour générer une réponse immunitaire spécifique au rotavirus dans le petit intestin et

au niveau systémique. Comme les stratégies vectorielles combinatoires, elles permettent de limiter la formation d'anticorps neutralisant les AdV après les immunisations. La voie intrarectale est un moyen d'améliorer l'emploi des AdV en vaccination. Il est important de souligner qu'un effet adjuvant de FljB est montré par cette voie pour la première fois.

5.4 FljB et effets adjuvants

5.4.1 Capacité de FljB à stimuler une réponse innée *in vitro*

Dans le chapitre II, FljB a été exprimée en fusion avec la protéine chimérique VP4Δ::VP7 du rotavirus dans les macrophages J774A.1 grâce à deux systèmes d'AdV différents. Contrairement aux cellules qui portent le récepteur CAR, les cellules qui n'en ont pas sont peu permissives à une infection par des AdV et internalisent ceux-ci de 100 à 1000 fois moins (Zsengeller et al., 2000). Ceci justifie les MOI de 250 ou 1000 employés pour infecter des cellules J774A.1 au lieu des MOI de 1 ou 10 employés pour des cellules A549 pour permettre l'observation de l'expression de FljB et des protéines du rotavirus. Les macrophages sont dépourvus du récepteur CAR comme toutes les cellules issues des cellules souches hématopoïétiques. Ils internalisent alors les AdV de manière moins efficace via les intégrines $\alpha_v\beta_3$ ou $\alpha_v\beta_5$ (Huang et al., 1995; Zsengeller et al., 2000).

Nous sommes les premiers à rapporter qu'une flagelline en fusion avec d'autres antigènes peut induire une réponse innée lorsqu'elle est exprimée par des macrophages. L'activation de l'inflammasome par l'IPAF est un mécanisme possible à cette activation (Miao et al., 2007). Ces résultats s'ajoutent aux observations de Tosh et ses collaborateurs qui ont démontré que des AdV non réplicatifs exprimant FlaA de *L. monocytogenes* non fusionnée à une autre protéine ont permis l'induction de la maturation de cellules dendritiques dérivées de monocytes humains en augmentant l'expression de CD86 et la production de TNF- α (Tosch et al., 2009). Une autre étude a montré que FliC exprimée grâce à un plasmide a aussi induit la maturation de monocytes humains (Appelquist et al., 2005). FliC exprimée par un vecteur VSV conduit aussi à la maturation de cellules dendritiques humaines et en une production d'IL-6 et d'IL-1 β (Ahmed et al., 2010). La FIA de *L. pneumophila* exprimée par des vecteurs rétroviraux non réplicatifs induit quant à elle la production

d'IL-1 β dans des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse via l'activation de l'inflammasome (Lightfield et al., 2008). Dans toutes ces études les flagellines sont exprimées directement dans les cellules grâce à un vecteur, mais une autre étude montre qu'en transfectant des macrophages J774A.1 avec les protéines FljB ou FliC, l'inflammasome n'était pas activé et aucune sécrétion d'IL-1 β n'était mesurée (Simon et Samuel, 2008). Pour voir une telle activation un pré-traitement des cellules avec du lipopolysaccharide (LPS) devait être réalisé (Simon et Samuel, 2008). Dans le chapitre III, un tel traitement n'a pas été nécessaire et il se peut que l'infection par l'AdV ou un autre vecteur viral (Ahmed et al., 2010; Lightfield et al., 2008) puisse déclencher une réponse innée (un premier signal inflammatoire) qui permet par la suite une activation de l'inflammasome par la flagelline exprimée lors de l'infection.

Pour finir, la flagelline ne serait pas le premier adjuvant dont le mécanisme d'action reposerait sur l'activation de l'inflammasome. En effet, l'Alum s'avère être un activateur de l'inflammasome dans les cellules dendritiques via une reconnaissance intracellulaire par NALP3 suivi d'une production d'IL-1 β (Kool et al., 2008).

5.4.2 Réplication des AdV et FljB, un effet synergique sur la réponse innée?

Pour augmenter l'expression d'un transgène, l'équipe de Dr. B. Massie a développé des AdV réplcatifs, non disséminatifs (Bourbeau et al., 2007). Par conséquent, le nombre de copies du gène d'intérêt est multiplié, ce qui augmente potentiellement l'expression du transgène et la présentation antigénique de celui-ci. Dans le chapitre III, la réplication de ces AdV a permis de produire 10 fois plus de protéine VP4 Δ ::VP7::FljB qu'avec un système d'AdV non réplcatifs de première génération dans un modèle *in vitro*. En employant comme transgène la séquence codant pour la protéine VP4 Δ ::VP7::FljB, le système d'AdV réplcatifs, non disséminatifs a permis d'obtenir une réponse immunitaire *in vivo* chez la souris

dirigée contre le rotavirus supérieure à celle obtenue avec le système non réplcatif. Cette différence peut être expliquée par l'augmentation de l'expression du transgène grâce à la réplication, hypothèse appuyée par les résultats d'expression *in vitro* et par d'autres études (Bourbeau et al., 2007). De plus, une réponse innée plus importante pourrait être générée à cause de la réplication de l'ADN de l'AdV. Pour appuyer cette hypothèse, les AdV réplcatifs, non disséminatifs exprimant la GFP ou différentes protéines rotavirales induisent un niveau faible d'IL-1 β par les macrophages J774A.1. D'autres groupes de chercheurs ont montré que l'ADN des AdV active l'inflammasome par le récepteur NALP3 appartenant aux NLR qui conduit à la production d'IL-1 β (Muruve, 2004; Zaiss et al., 2009; Zhu et al., 2007). Contrairement à ces études, nous n'avons pas mesuré de niveaux détectables d'IL-1 β dans les surnageants de macrophages infectés avec l'usage du système d'AdV non réplcatif exprimant la GFP. Cette différence peut-être expliquée par l'usage de doses d'AdV différentes entre notre étude et les autres, les macrophages étant peu permissifs à l'infection par les AdV (Zsengeller et al., 2000). Si ces virus entrent dans un macrophage, peu d'ADN viral se retrouve dans la cellule (peu permissive) lorsqu'il s'agit d'un système non réplcatif en comparaison avec un système réplcatif.

La production d'IL-6 et de TNF- α a été mesurée lors des infections *in vitro* des macrophages J774A.1 (résultats non montrés). Contrairement à l'IL-1 β dont la production est significativement reliée à l'expression de FljB dans ces cellules, la production des autres cytokines inflammatoires a augmenté avec l'expression de la flagelline mais furent aussi produites de manière très significative en l'absence de FljB. Le TNF- α peut être produit dans des cellules dendritiques suite à la reconnaissance de l'ADN des AdV par le TLR9 (Yamaguchi et al., 2007; Yoshio-Hoshino et al., 2007). Une étude *in vivo* a démontré que des macrophages alvéolaires produisent de l'IL-6 et du TNF- α suite à une infection par des AdV (Zsengeller et al., 2000). L'IL-1 β et le TNF- α peuvent amplifier la production d'IL-6 dans les macrophages J774A.1 (Martin et Dorf, 1990).

L'ADN des AdV est reconnu par le TLR9 et des récepteurs cytoplasmiques, conduisant ainsi à la production d'IFN de type I (Huarte et al., 2006; Zhu et al., 2007). La production d'IFN de type I pourrait être évaluée dans des macrophages J774A.1 infectés par les AdV réplcatifs, non disséminatifs exprimant les protéines présentées dans le chapitre III. Sachant que l'ADN viral est à l'origine de ce mécanisme, il se pourrait que le système d'AdV réplcatifs, non disséminatifs puisse augmenter la production d'IFN de type I dans les macrophages. Des AdV non réplcatifs pourront être étudiés comme témoins.

Il ne faut pas négliger que lors d'une infection virale par des AdV, les protéines du vecteur ainsi que le transgène exprimé dans le cytosol peuvent être dégradés par le protéasome. Une partie des peptides produits vont alors être excrétés hors de la cellule (Sigal et al., 1999). Il pourrait être envisagé qu'une proportion de FljB produite dans la cellule puisse se retrouver dans le milieu extracellulaire et se lier au TLR5 des macrophages J774A.1 déjà infectés ou non par les AdV. Une telle liaison est connue pour induire une sécrétion d'IL-6 par ces cellules (Shibata et al., 2012).

5.4.3 Pertinence du modèle des cellules J774A.1 et effet adjuvant de FljB *in vivo*

La lignée cellulaire J774A.1 est issue d'un monocyte murin d'un réticulosarcome, une prolifération maligne du tissu réticulo-endothélial originaire d'un tissu conjonctif. Contrairement aux macrophages présents dans la muqueuse colorectale possiblement infectés par les AdV dans l'étude *in vivo*, les macrophages J774A.1 ne sont pas issus d'un épithélium intestinal. Cette étude *in vitro* valide seulement le fait que des AdV exprimant FljB ont la capacité d'induire une réponse

innée dans des macrophages. Des extrapolations sur les mécanismes en jeu pour expliquer l'effet adjuvant de FljB administrée par voie intrarectale chez la souris sont difficilement réalisables. Par contre une manière de prouver que l'activation de l'inflammasome est à l'origine de l'effet adjuvant rapporté dans le chapitre III serait d'effectuer des immunisations chez des souris «knock-out» pour la caspase-1 (Amer et al., 2006). Pour montrer que cette activation dépend de la reconnaissance de FljB par l'IPAF, des souris« knock-out» pour ce NLR pourront aussi être employées (Amer et al., 2006).

5.4.4 FljB et inflammation *in vivo*

Comme FljB a la capacité d'induire une réponse innée *in vitro*, une réponse inflammatoire *in vivo* a été évaluée peu de temps après l'introduction des AdV dans le côlon des souris. Cette étude est motivée non seulement par le fait qu'une administration intradermale de plasmide FliC provoque une inflammation locale (gonflement et ulcération) au site d'injection (Applequist et al., 2005), mais aussi par l'observation de signes cliniques (prostration et piloérection) 48h-72h après l'inoculation des AdV exprimant VP4Δ::VP7::FljB chez un ou deux individus. De plus, Zhu et ses collaborateurs ont montré qu'après une inoculation d'AdV par voie intrarectale, le transgène était exprimé de manière optimale dans les cellules épithéliales et les cellules de la lamina propria entre 24h et 72h suivant cette inoculation (Zhu et al., 2008). Nous avons donc effectué notre étude 48h après l'inoculation des AdV et comme discuté précédemment, aucune augmentation significative d'IL-1β (chapitre III), d'IL-6 et TNF-α (Fig. A2) n'a été mesurée dans le côlon des animaux ayant reçus des AdV exprimant ou non FljB. Cependant quelques animaux ont montré des signes cliniques. Même si une réponse inflammatoire suite à l'expression de VP4Δ::VP7::FljB a eu lieu, elle ne s'est pas traduite en une production de cytokines telles que celle provoquée par l'administration de TNBS. Ce produit provoque à long terme une colite chronique chez les souris et sert à induire

des pathologies inflammatoires de l'intestin qui sont des modèles des colites ulcératives du syndrome de Crohn chez l'homme (Bai et al., 2010; Mahida, 2000; Ogata et Hibi, 2003). Le fait qu'un adjuvant n'induit pas de réaction inflammatoire trop importante est un bon argument en faveur de son emploi en santé humaine (Ahmed et al., 2011).

5.4.5 AdV réplcatif non disséminatif exprimant FljB et thérapie anti-cancer

Dans le chapitre III, des AdV réplcatifs non disséminatifs exprimant FljB seule ont été élaborés pour servir de témoin. Cette construction pourrait être employée à d'autres fins médicales dans des applications en thérapie anti-cancer. En effet, la flagelline de *L. monocytogenes* exprimée par des AdV non réplcatifs a montré des effets anti-cancer dans un modèle murin de xénogreffe de mélanome (Tosch et al., 2009). Des injections directes de flagelline de *S. typhimurium* dans des tumeurs ont mis en évidence un ralentissement de la croissance de la tumeur via l'attraction de neutrophiles dans un modèle murin de xénogreffes du cancer du côlon (Rhee et al., 2008). D'autre part, les AdV réplcatifs, non disséminatifs permettent d'augmenter les effets anti-tumeur d'un transgène par rapport à un système non réplcatif et d'avoir le même niveau d'efficacité qu'un système réplcatif mais disséminatif (Bourbeau et al., 2007). Comme évoqué précédemment, il se peut que la réplication des AdV induise une production d'IFN de type I supérieure à celle induite par des AdV non réplcatifs (Nociari et al., 2007; Randall et Goodbourn, 2008; Russell, 2009). Des études ont montré l'importance de l'IFN- α pour activer la production et la sécrétion de TRAIL (pour «TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand») par les neutrophiles pour lyser des cellules tumorales (Cassatella et al., 2006; Kamohara et al., 2004; Tecchio et al., 2004). De plus, un traitement à base de CpG induisant la production d'IFN- α par l'activation du TLR9 a provoqué un effet anti-tumeur dans un modèle murin de xénogreffe (Rayburn et al., 2007).

Pour conclure, l'effet adjuvant de FljB a été démontré avec deux différents systèmes d'administration par des voies mucosales. Avec le premier système, FljB est fusionnée à un antigène et exprimée directement dans les cellules du sujet vacciné grâce à un AdV. Un des mécanismes d'action de cet adjuvant pourrait être une activation de l'inflammasome des cellules présentatrices d'antigène présentes dans la muqueuse colorectale. Avec le second système, FljB est exprimée dans les tissus des feuilles de tabac transgéniques. Ces feuilles sont administrées en mélange avec un antigène par voie orale. Il est à noter que les plantes seules permettent aussi une meilleure réponse contre l'antigène en accélérant cette réponse immunitaire. Un mécanisme d'action possible de cet adjuvant serait l'activation d'une réponse innée par une reconnaissance par le TLR5.

CONCLUSIONS

Les plus grands succès de la vaccination sont l'éradication de la variole et la quasi-disparition de la poliomyélite. Paradoxalement la disparition de maladies mortelles ou invalidantes devient aujourd'hui un frein au développement de vaccins. En effet, les bénéfices obtenus paraissent moins importants comparés aux risques associés à la prise d'un vaccin contre des maladies avec une incidence moindre que celles citées précédemment (Ahmed et al., 2011). Ces risques sont les effets secondaires provoqués par les vaccins. De plus, des effets secondaires graves entraînant la mort comme les cas d'invaginations intestinales provoqués par le vaccin Rotashield ont des effets dévastateurs sur le public (Vesikari, 2012). Une partie de la population choisira d'arrêter de se faire vacciner contre la maladie en question mais aussi contre d'autres maladies. Ce comportement favorise malheureusement une réémergence de certaines maladies (Ahmed et al., 2011; Plotkin, 2005). C'est pourquoi, la sécurité liée à la prise d'un vaccin est un enjeu majeur. Cette thèse répond à cette problématique avec le développement de vaccins sous-unitaires.

Ces travaux avaient pour objectifs de montrer l'utilité d'antigènes chimériques comme vaccin sous-unitaire contre le rotavirus humain, d'étudier si des AdV réplicatifs, non disséminatifs sont des vecteurs efficaces pour administrer ces antigènes et enfin de montrer un effet adjuvant de la protéine FljB.

Concernant le premier objectif, la protéine chimérique VP4Δ::VP7 a permis de générer une réponse en anticorps et notamment en anticorps neutralisant la souche Wa du rotavirus plus forte que l'administration d'un mélange de VP4 et VP7. Ces anticorps neutralisants sont cruciaux pour une protection contre le rotavirus (Franco et al., 2006; Plotkin, 2010). Le chapitre II a permis d'établir que la protéine

VP4Δ::VP7 est un immunogène pertinent pour l'élaboration de vaccins sous-unitaire. Pour confirmer ces résultats une expérience de défi pourrait être conduite dans un modèle de porcs gnotobiotiques. Il serait aussi pertinent de vérifier si les anticorps neutralisants générés peuvent protéger contre des souches du rotavirus appartenant au groupe G1P[8] mais aussi contre des souches G1 avec d'autres groupe P et des souches P[8] combinées avec d'autres groupes G.

Pour répondre au deuxième objectif, les chapitres II et III ont démontré pour la première fois que les AdV réplicatifs mais non disséminatifs sont des vecteurs efficaces pour administrer des antigènes par voie intramusculaire et par voie rectale. Ils assurent aussi une plus grande sécurité que des AdV réplicatifs puisqu'ils sont incapables de former des particules infectieuses après avoir été introduits chez un sujet. Leur emploi par voie rectale présenterait un autre avantage par rapport à une injection intramusculaire puisqu'ils pourraient être formulés dans des suppositoires pour des applications chez l'homme. Dans nos travaux, ces AdV ont permis de générer des réponses en anticorps et une réponse cellulaire (mixte Th1/Th2) contre le rotavirus humain. L'utilisation de ces vecteurs peut être optimisée en limitant la réponse en anticorps neutralisant le vecteur par le recours à une stratégie vectorielle combinatoire AdV/plasmide par voie intramusculaire. Les quantités d'anticorps neutralisant ces vecteurs peuvent aussi être réduites par l'utilisation de la voie intrarectale. La réplication de ces vecteurs est un atout pour les vaccinations car elle augmente la production des antigènes dans les cellules infectées. La réplication de ces vecteurs a aussi permis de générer une réponse immunitaire plus forte contre le rotavirus chez la souris. Il serait intéressant de déterminer si cet effet est aussi la conséquence d'une activation plus forte de l'immunité innée due à la réplication des AdV.

Les chapitres III et IV ont permis de répondre au troisième objectif en mettant en évidence un effet adjuvant de FljB par deux nouvelles méthodes d'administration

chez la souris. Dans le chapitre III, FljB a été fusionnée à des antigènes du rotavirus et a été produite directement dans le cytoplasme des cellules grâce à des AdV. Sa présence a permis d'augmenter la réponse en anticorps spécifiques au rotavirus. Le mécanisme responsable de cet effet pourrait être une activation de l'inflammasome des cellules immunitaires présentes dans la muqueuse colorectale. Dans le chapitre IV, FljB a été produite seule dans des plantes transgéniques. Ces plantes mélangées à un antigène administré par voie orale chez la souris ont montré un effet adjuvant en accélérant et en modulant (orientation Th1/Th2 au lieu de Th2) la réponse immunitaire contre l'antigène. Le mécanisme d'action serait une activation de TLR5 porté par de nombreuses cellules de la muqueuse intestinale. Ces résultats sont aussi très novateurs car ils montrent l'effet adjuvant de FljB par des voies mucosales dont l'emploi permet d'optimiser les réponses induites par des vaccins sous-unitaires.

En conclusion, ces travaux ont permis d'apporter plusieurs nouveautés dans la recherche portant sur les vaccins sous-unitaires en proposant un nouvel immunogène pour vacciner contre le rotavirus, en montrant l'efficacité d'un nouveau vecteur et enfin en montrant l'effet adjuvant de FljB par deux différentes stratégies d'administration. Il est clair aujourd'hui que l'usage d'une seule dose et d'une seule voie d'administration ne peut s'appliquer à tous les vaccins. Ceci est d'autant plus vrai pour les vaccins sous-unitaires qui sont moins efficaces que les pathogènes vivants atténués. Pour faire suite à ce projet plusieurs avenues sont possibles en combinant des vecteurs et/ou des voies d'administrations. Par exemple pour élaborer un vaccin sous-unitaire contre le rotavirus, les AdV réplicatifs non disséminatifs exprimant VP4::VP7::FljB pourraient être injectés par voie intrarectale suivi d'un rappel effectué par voie orale avec du rotavirus inactivé mélangé à des plantes exprimant FljB. Cette combinaison pourrait permettre de maximiser la réponse en anticorps et la réponse cellulaire au niveau du petit intestin et au niveau systémique. Les plantes exprimant FljB pourront aussi être employées comme adjuvant avec des vaccins protéiques sous-unitaires qui n'induisent pas une réponse Th1 par voie orale.

APPENDICE A

TABLEAUX ET FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

Tableau A.1 : Positions et séquences des épitopes ciblés par des anticorps neutralisant le rotavirus.

	VP7 (38 kDa) (Pesavento et al., 2006)	VP4 (85 kDa) (Pesavento et al., 2006) clivée en VP8 (acides aminés 1-247; 27 kDa) et VP5 (aa 248-776; 58 kDa)
Épitopes neutralisants immunodominants	Position / Séquence : 87-101 / TEAATEINDNSWKDT (Huang et al., 2000) 142-153 / MKYDATLQLDVMSE (Huang et al., 2000) 201-210 / QTLGIGCLTT (Huang et al., 2000)	Position / Séquence : 1-10 / MASLIYRQLL (Kovacs-Nolan et al., 2003) 55-66 / INDSTTVEPILD (Kovacs-Nolan et al., 2003) 223-234 / PPIQNTRNVVP (Kovacs-Nolan et al., 2003) 278-285 / PASSIVKS*** (Dormitzer et al., 2004) 289-297 / YKWSEISPK*** (Dormitzer et al., 2004) 323-330 / MNDFNFNG (Dormitzer et al., 2004) 337-345 / FVISRYEVI (Dormitzer et al., 2004) 413-423 / STQFDFVSLNS (Dormitzer et al., 2004) *** le site de liaison DGE aux intégrines est situé entre ces deux épitopes.

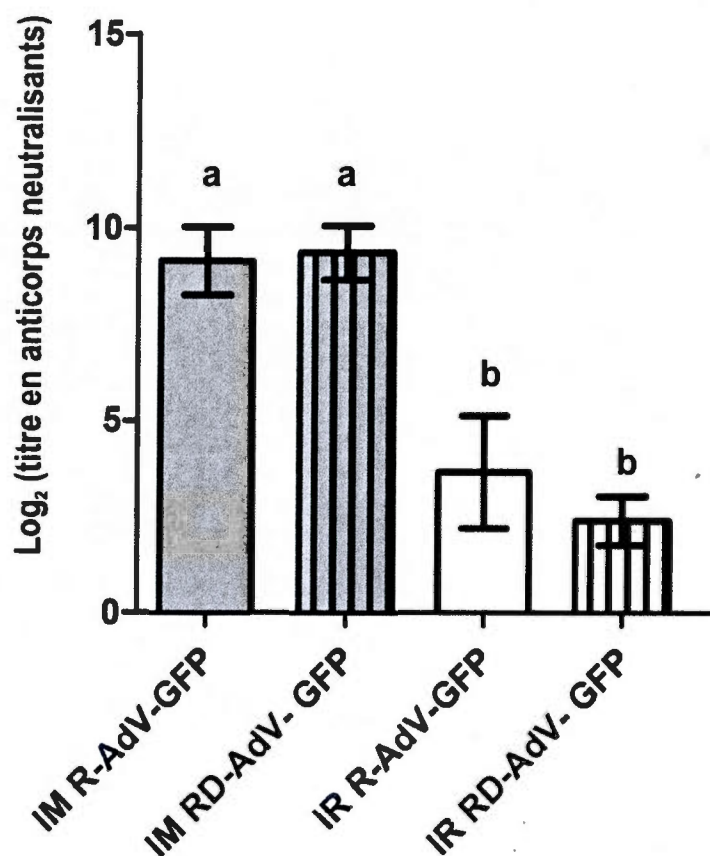


Figure A.1 : Anticorps neutralisants les AdV générés dans le sérum de souris après des immunisations intramusculaires (IM) ou intrarectales d'AdV (IR) réplicatifs, non disséminatifs (R-AdV) ou d'AdV non réplicatifs (RD-AdV).

Quatre groupes de souris BALB/c ($n=8$) ont reçu deux injections de 100 μ l de 10^8 TCID₅₀ de R-AdV ou RD-AdV exprimant la GFP au jour 0 et 21. Au jour 42 après la première immunisation, les souris ont été euthanasiées et un test de séroneutralisation a été effectué comme décrit ailleurs avec des modifications (Zeng et al., 2007). Brièvement, les sérums de souris ont été inactivés, dilués en série et incubés 2 h avec des RD-AdV-GFP. Des cellules HEK 293A ont été par la suite infectées pendant 2 h avec 100 μ l du mélange sérum-RD-AdV-GFP titrant à 100 TCID₅₀. Les cellules ont ensuite été cultivées dans du milieu DMEN et SVF 2 % jusqu'à ce que le témoin négatif montre 90 % d'effet cytopathique. Le titre en anticorps neutralisant représente l'inverse de plus grande dilution pour laquelle aucun effet cytopathique n'est observé. Les barres représentent la moyenne (\pm écarts types) du Log₂ des titres en anticorps neutralisant les AdV. Des lettres différentes signifient que les valeurs des moyennes sont statistiquement différentes à $P<0.005$ par une ANOVA suivi d'un test de Tukey.

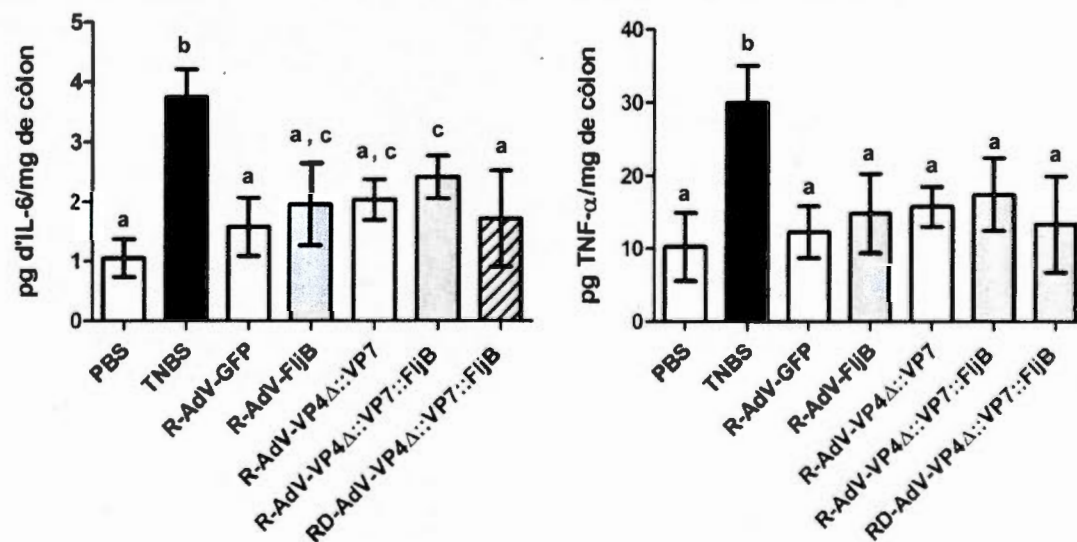


Figure A.2 : Production d'IL-6 et de TNF- α dans les côlons de souris 48 h après des injections intrarectales d'AdV.

Cette figure complète la figure 3.6B. Les échantillons ont été obtenus selon la méthodologie décrite pour la figure précédente. Les barres représentent la moyenne (n=6 souris) avec écarts-types des quantités de cytokines mesurées par des tests ELISA quantitatifs (BD OptEIA™, BD Biosciences). Des lettres différentes signifient que les valeurs des moyennes sont statistiquement différentes à $P < 0.005$ par une ANOVA suivi d'un test de Tukey.

APPENDICE B

ARTICLES SCIENTIFIQUES

EXPRESSION OF HUMAN ROTAVIRUS CHIMERIC FUSION PROTEINS FROM REPLICATING BUT NON DISSEMINATING ADENOVECTORS AND ELICITATION OF ROTAVIRUS-SPECIFIC IMMUNE RESPONSES IN MICE

Aurélie Girard, Élodie Roques, Marie-Claude St-Louis, Bernard Massie and
Denis Archambault

Article publié dans **Molecular Biotechnology**, (2013) Jul;54(3):1010-20

Abstract

The aim of this study was to evaluate the usefulness of replicating but non disseminating adenovirus vectors (AdVs) as vaccine vector using human rotavirus (HRV) as a model pathogen. HRV VP7, VP4, or VP4  (N-terminal 336 amino acids of VP4) structural proteins as well as the VP4 :VP7 chimeric fusion protein were expressed in mammalian cells when delivered with the AdVs. A preliminary experiment demonstrated that VP4  was able to induce a HRV-specific IgG response in BALB/c mice inoculated intramuscularly with AdVs expressing the rotaviral protein. Moreover, an AdV-prime/plasmid DNA-boost regimen of vectors resulted in VP4 -specific antibody (Ab) titers ~4 times higher than those obtained from mice immunized with AdVs alone. Subsequently, the various HRV protein-encoding AdVs were compared using the AdV-prime/plasmid DNA-boost regimen. Higher IgG and IgA responses to HRV were obtained when VP4 :VP7 fusion protein was used as an immunogen as compared to VP7 or VP4 alone or to a mix of both proteins delivered independently by AdVs. A synergetic effect in terms of Ab was obtained with VP4 :VP7. In conclusion, this study demonstrated for the first time the suitability of using replicating but non disseminating AdVs as vaccine vector and the VP4 :VP7 fusion protein as an immunogen for vaccination against HRV.

ANTIBODY RESPONSES INDUCED IN MICE IMMUNIZED WITH RECOMBINANT ADENOVECTORS EXPRESSING CHIMERIC PROTEINS OF VARIOUS PORCINE PATHOGENS

Élodie Roques, Aurélie Girard, Carl A. Gagnon, Denis Archambault.

Article publié dans **Vaccine**, (2013) May 31;31(24):2698-704

Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), Porcine Circovirus type 2 (PCV2) and *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* are swine pathogens of economic importance. Although vaccines are available for each pathogen, no commercial bivalent vaccines have been developed so far. In this study, recombinant adenovectors (AdVs) expressing proteins of each pathogen were developed and their immunogenicity tested in mice. The proteins of interest were the glycoprotein GP5 of PRRSV, the capsid (Cap) protein of PCV2b and the C-terminal portion of P97 (P97c) protein of *M. hyopneumoniae* that were used alone and/or in fusion with each other. Inoculation of mice with the AdVs resulted in antibody (Ab) responses specific to the immunogens. Unexpectedly, immunization with vaccines expressing P97c in fusion to either Cap or GP5 enhanced the Ab responses against Cap and GP5, suggesting an immunopotentiator effect for P97c.

**IMMUNOGENIC AND PROTECTIVE PROPERTIES OF GP5
AND M STRUCTURAL PROTEINS OF PORCINE
REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS
EXPRESSED FROM REPLICATING BUT NONDISSEMINATING
ADENOVECTORS**

Roques Élodie, Aurélie Girard, Marie-Claude St-Louis MC, Bernard Massie, Carl A.
Gagnon, Martin Lessard and Denis Archambault.

Article publié dans **Veterinary Research**, (2013) Mar 11;44(1):17

Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is responsible for significant economic losses in the porcine industry. Currently available commercial vaccines do not allow optimal and safe protection. In this study, replicating but nondisseminating adenovectors (rAdV) were used for the first time in pigs for vaccinal purposes. They were expressing the PRRSV matrix M protein in fusion with either the envelope GP5 wild-type protein (M-GP5) which carries the major neutralizing antibody (NAb)-inducing epitope or a mutant form of GP5 (M-GP5m) developed to theoretically increase the NAb immune response. Three groups of fourteen piglets were immunized both intramuscularly and intranasally at 3-week intervals with rAdV expressing the green fluorescent protein (GFP, used as a negative control), M-GP5 or M-GP5m. Two additional groups of pigs were primed with M-GP5m-expressing rAdV followed by a boost with bacterially-expressed recombinant wild-type GP5 or were immunized twice with a PRRSV inactivated commercial vaccine. The results show that the rAdV expressing the fusion proteins of interest induced systemic and mucosal PRRSV GP5-specific antibody response as determined in an ELISA. Moreover the prime with M-GP5m-expressing rAdV and boost with recombinant GP5 showed the highest antibody response against GP5. Following

PRRSV experimental challenge, pigs immunized twice with rAdV expressing either M-GP5 or M-GP5m developed partial protection as shown by a decrease in viremia overtime. The lowest viremia levels and/or percentages of macroscopic lung lesions were obtained in pigs immunized twice with either the rAdV expressing M-GP5m or the PRRSV inactivated commercial vaccine.

FLAGELLIN PRODUCED IN PLANTS IS A POTENT ADJUVANT FOR ORAL IMMUNIZATION

Aurélie Girard, Wifried Saron, Louis-Philippe Bergeron-Sandoval, Fathey Sarhan and Denis Archambault.

Article publié dans **Vaccine**, (2011) Sep 2;29(38):6695-703

Abstract

The aim of this study was to produce adjuvant with high biosafety, efficacy and low cost. Towards this goal, the plant *Nicotiana benthamiana* transient expression system was successfully used to express *Salmonella typhimurium*'s flagellin (FljB). The yield of the expressed FljB was 280 mg per kg of fresh weight (FW) leaves. The lyophilized plant powder containing plant expressing FljB was mixed with ovalbumin (OVA) and used for oral immunization of BALB/c mice. The ELISA analysis showed higher and accelerated OVA-specific serum antibody responses in mice given the mixture when compared to animals receiving OVA alone. Furthermore, FljB elicited a mixed Th1/Th2 response as shown by the presence of specific anti-OVA IgG1, IgG2a and IgG2b isotypes. OVA-specific IgAs were also detected in mice given the mixture. Cell-mediated immune response to OVA was induced by FljB as determined by a spleen lymphocyte specific proliferation test. No immune response was generated against FljB. In conclusion, our results showed for the first time the production of FljB in plants and the efficient use of the crude lyophilized extract as an adjuvant for oral immunization.

PRODUCTION OF HUMAN ROTAVIRUS AND SALMONELLA ANTIGENS IN PLANTS AND ELICITATION OF FLJB-SPECIFIC HUMORAL RESPONSES IN MICE

Louis-Philippe Bergeron-Sandoval, Aurélie Girard, François Ouellet, Denis Archambault and Fathey Sarhan.

Article publié dans **Molecular Biotechnology**, (2011) 47:157–168

Abstract

A *Nicotiana benthamiana* transient expression system was used to express single antigen and dimeric combinations of the human rotavirus (HRV) VP7 and a truncated VP4 (VP4 Δ) proteins fused with *Salmonella typhimurium*'s flagellin fljB subunit. Immunoblot analyses using rabbit antibodies generated against these proteins demonstrated that the constructs were successfully expressed with yields ranging from 0.85 to 31.97 μ g of recombinant protein per gram of fresh leaf tissue. Expressing the single and dimeric antigens has no effect on plant growth and development except for VP7 and VP4 Δ ::VP7, which show mild necrotic lesions. Immunization of mice with proteins from leaves transformed with constructs bearing the fljB moiety elicited an fljB-specific humoral response. The *Nicotiana benthamiana* transient system is efficient to express multiple combinations of pathogen proteins and demonstrates the potential of generating a *Salmonella typhimurium* subunit vaccine in plants.

APPENDICE C

PARTICIPATIONS À DES CONGRÈS SCIENTIFIQUES

Effet immunopotentiateur de deux protéines structurales bactériennes, la flagelline de *Salmonella typhimurium* et la P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae* dans le cadre d'immunisation antivirale. A. Girard, É. Roques, C. Gagnon et D. Archambault. **Résumé et Affiche** au 5^{ième} congrès annuel du Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Saint-Hyacinthe, 2012.

Différentes approches vaccinales contre le rotavirus humain avec un système d'adénovecteur réplcatif mais non disséminatif. A. Girard, M.-C. St-Louis, E. Roques, P. Cournoyer, B. Massie et D. Archambault. **Résumé et Affiche** au 2^{ième} Colloque annuel PharmaQAM, Université du Québec à Montréal, 2010.

➤ **Prix pour meilleure affiche.**

Capacité adjuvante de la flagelline de *Salmonella typhimurium* produite dans des plantes. A. Girard, W. Saron, F. Sarhan et D. Archambault. **Résumé et présentation orale** au 2^{ième} Colloque annuel PharmaQAM, Université du Québec à Montréal, 2010.

Immunization approaches against Human Rotavirus using replicative but non disseminating Adeovovirus delivery system. A. Girard, M.-C. St-Louis, E. Roques, B. Massie and D. Archambault. **Résumé et Affiche** au 5^{ième} Symposium canadien de thérapie génique et vaccins, Hôtel du Lac Carling, Québec, 2010.

➤ **Prix pour meilleure affiche.**

Immunogénicité comparative chez la souris de la protéine VP8::VP5_{dc-term} du rotavirus délivrée par une combinaison d'adénovecteur et plasmide. A. Girard, M.-C. St-Louis, Massie B., Archambault D. **Résumé et Affiche** au congrès Armand frappier, Bromont, 2009.

Expression des protéines VP8 ::VP5_{dc-term} du rotavirus dans les plantes transgéniques et les adénovecteurs pour le développement de vaccins mucosaux. A. Girard, Bergeron-Sandoval, L.P., M.-C. St-Louis, Massie B., Sarhan F. et Archambault D. **Résumé et présentation orale** au 4^{ième} Colloque international francophone de microbiologie animale, Saint-Hyacinthe, 2008.

➤ **Deuxième prix pour meilleure présentation orale.**

Production of the human rotavirus VP8::VP5_{c-term} protein in plant and viral expression systems towards the development of new-generation vaccines. A. Girard, Bergeron-Sandoval, L.P., M.-C. St-Louis, Massie B., F. Sarhan. And Archambault D. **Résumé et Affiche** au

- ✓ 50^{ième} congrès de la société canadienne des physiologistes des végétaux, SCVP, Ottawa, 2008.
- ✓ 4^{ième} Symposium canadien de thérapie génique et vaccins, Montréal, 2008.

Immunogenicity of a Transmission-Blocking DNA Vaccine Encoding the Cyst Wall Protein 2 of *Giardia lamblia*. Abdul Wahid, A. Girard, G. Faubert. **Résumé et Affiche** au

- ✓ 4^{ième} Congrès international Giardia-Cryptosporidium, Amsterdam, 2004.
- ✓ Congrès international d'immunologie et 4^{ième} congrès annuel du FOCIS, Montréal, 2004

RÉFÉRENCES

- Abdul-Wahid, A., et Faubert, G. (2007). Mucosal delivery of a transmission-blocking DNA vaccine encoding *Giardia lamblia* CWP2 by *Salmonella typhimurium* bactofection vehicle. *Vaccine* 25(50), 8372-8383.
- Abu-Qarn, M., Eichler, J., et Sharon, N. (2008). Not just for Eukarya anymore: protein glycosylation in Bacteria and Archaea. *Curr Opin Struct Biol* 18(5), 544-550.
- Agnello, D., Herve, C. A., Lavaux, A., Darniot, M., Guillon, P., Charpilienne, A., et Pothier, P. (2006). Intrarectal immunization with rotavirus 2/6 virus-like particles induces an antirotavirus immune response localized in the intestinal mucosa and protects against rotavirus infection in mice. *J Virol* 80(8), 3823-3832.
- Ahmed, M., Puckett, S., Arimilli, S., Braxton, C. L., Mizel, S. B., et Lyles, D. S. (2010). Stimulation of human dendritic cells by wild-type and M protein mutant vesicular stomatitis viruses engineered to express bacterial flagellin. *J Virol* 84(22), 12093-12098.
- Ahmed, S. S., Plotkin, S. A., Black, S., et Coffman, R. L. (2011). Assessing the safety of adjuvanted vaccines. *Sci Transl Med* 3(93), 93rv92.
- Akira, S., Yamamoto, M., et Takeda, K. (2003). Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 3), 637-642.
- Alaniz, R. C., Cummings, L. A., Bergman, M. A., Rassouljian-Barrett, S. L., et Cookson, B. T. (2006). *Salmonella typhimurium* coordinately regulates *FliC* location and reduces dendritic cell activation and antigen presentation to CD4+ T cells. *J Immunol* 177(6), 3983-3993.
- Alba, R., Bosch, A., et Chillon, M. (2005). Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther* 12 Suppl 1, S18-27.
- Amer, A., Franchi, L., Kanneganti, T. D., Body-Malapel, M., Ozoren, N., Brady, G., Meshinchi, S., Jagirdar, R., Gewirtz, A., Akira, S., et Nunez, G. (2006). Regulation of *Legionella* phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J Biol Chem* 281(46), 35217-35223.

- Andres, I., Rodriguez-Diaz, J., Buesa, J., et Zueco, J. (2006). Yeast expression of the VP8* fragment of the rotavirus spike protein and its use as immunogen in mice. *Biotechnol Bioeng* 93(1), 89-98.
- Angel, J., Franco, M. A., et Greenberg, H. B. (2007). Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol* 5(7), 529-539.
- Angel, J., Franco, M. A., et Greenberg, H. B. (2012). Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Current opinion in virology* 2(4), 419-425.
- Aoki, S. T., Trask, S. D., Coulson, B. S., Greenberg, H. B., Dormitzer, P. R., et Harrison, S. C. (2011). Cross-linking of rotavirus outer capsid protein VP7 by antibodies or disulfides inhibits viral entry. *J Virol* 85(20), 10509-10517.
- Applequist, S. E., Rollman, E., Wareing, M. D., Liden, M., Rozell, B., Hinkula, J., et Ljunggren, H. G. (2005). Activation of innate immunity, inflammation, and potentiation of DNA vaccination through mammalian expression of the TLR5 agonist flagellin. *J Immunol* 175(6), 3882-3891.
- Arlen, P. A., Singleton, M., Adamovicz, J. J., Ding, Y., Davoodi-Semiromi, A., et Daniell, H. (2008). Effective plague vaccination via oral delivery of plant cells expressing F1-V antigens in chloroplasts. *Infect Immun* 76(8), 3640-3650.
- Arnberg, N. (2009). Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev Med Virol* 19(3), 165-178.
- Arvin, A. M., et Greenberg, H. B. (2006). New viral vaccines. *Virology* 344(1), 240-249.
- Azevedo, M. S., Yuan, L., Jeong, K. I., Gonzalez, A., Nguyen, T. V., Pouly, S., Gochnauer, M., Zhang, W., Azevedo, A., et Saif, L. J. (2005). Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. *J Virol* 79(9), 5428-5436.
- Azevedo, M. S., Yuan, L., Pouly, S., Gonzales, A. M., Jeong, K. I., Nguyen, T. V., et Saif, L. J. (2006). Cytokine responses in gnotobiotic pigs after infection with virulent or attenuated human rotavirus. *J Virol* 80(1), 372-382.
- Bai, A., Ma, A. G., Yong, M., Weiss, C. R., Ma, Y., Guan, Q., Bernstein, C. N., et Peng, Z. (2010). AMPK agonist downregulates innate and adaptive immune responses in TNBS-induced murine acute and relapsing colitis. *Biochemical pharmacology* 80(11), 1708-1717.
- Bangari, D. S., et Mittal, S. K. (2006). Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *Vaccine* 24(7), 849-862.

- Bargieri, D. Y., Leite, J. A., Lopes, S. C., Sbrogio-Almeida, M. E., Braga, C. J., Ferreira, L. C., Soares, I. S., Costa, F. T., et Rodrigues, M. M. (2010). Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist *FliC* flagellin of *Salmonella typhimurium*. *Vaccine* 28(16), 2818-2826.
- Bargieri, D. Y., Rosa, D. S., Braga, C. J., Carvalho, B. O., Costa, F. T., Espindola, N. M., Vaz, A. J., Soares, I. S., Ferreira, L. C., et Rodrigues, M. M. (2008). New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella Typhimurium FliC* flagellin. *Vaccine* 26(48), 6132-6142.
- Barman, P., Ghosh, S., Samajdar, S., Mitra, U., Dutta, P., Bhattacharya, S. K., Krishnan, T., Kobayashi, N., et Naik, T. N. (2006). RT-PCR based diagnosis revealed importance of human group B rotavirus infection in childhood diarrhoea. *J Clin Virol* 36(3), 222-227.
- Barouch, D. H., Kik, S. V., Weverling, G. J., Dilan, R., King, S. L., Maxfield, L. F., Clark, S., Ng'ang'a, D., Brandariz, K. L., Abbink, P., Sinangil, F., de Bruyn, G., Gray, G. E., Roux, S., Bekker, L. G., Dilraj, A., Kibuuka, H., Robb, M. L., Michael, N. L., Anzala, O., Amornkul, P. N., Gilmour, J., Hural, J., Buchbinder, S. P., Seaman, M. S., Dolin, R., Baden, L. R., Carville, A., Mansfield, K. G., Pau, M. G., et Goudsmit, J. (2011). International seroepidemiology of adenovirus serotypes 5, 26, 35, and 48 in pediatric and adult populations. *Vaccine* 29(32), 5203-5209.
- Bates, J. T., Graff, A. H., Phipps, J. P., Grayson, J. M., et Mizel, S. B. (2011). Enhanced antigen processing of flagellin fusion proteins promotes the antigen-specific CD8+ T cell response independently of TLR5 and MyD88. *J Immunol* 186(11), 6255-6262.
- Bates, J. T., Honko, A. N., Graff, A. H., Kock, N. D., et Mizel, S. B. (2008). Mucosal adjuvant activity of flagellin in aged mice. *Mech Ageing Dev.*
- Belyakov, I. M., et Ahlers, J. D. (2009). What role does the route of immunization play in the generation of protective immunity against mucosal pathogens? *J Immunol* 183(11), 6883-6892.
- Belyakov, I. M., Hel, Z., Kelsall, B., Kuznetsov, V. A., Ahlers, J. D., Nacsa, J., Watkins, D. I., Allen, T. M., Sette, A., Altman, J., Woodward, R., Markham, P. D., Clements, J. D., Franchini, G., Strober, W., et Berzofsky, J. A. (2001). Mucosal AIDS vaccine reduces disease and viral load in gut reservoir and blood after mucosal infection of macaques. *Nat Med* 7(12), 1320-1326.
- Ben-Yedidia, T., et Arnon, R. (1998). Effect of pre-existing carrier immunity on the efficacy of synthetic influenza vaccine. *Immunol Lett* 64(1), 9-15.

- Benureau, Y., Huet, J. C., Charpilienne, A., Poncet, D., et Cohen, J. (2005). Trypsin is associated with the rotavirus capsid and is activated by solubilization of outer capsid proteins. *J Gen Virol* 86(Pt 11), 3143-3151.
- Bergeron-Sandoval, L. P., Girard, A., Ouellet, F., Archambault, D., et Sarhan, F. (2011). Production of human rotavirus and Salmonella antigens in plants and elicitation of fljB-specific humoral responses in mice. *Mol Biotechnol* 47(2), 157-168.
- Bertolotti-Ciarlet, A., Ciarlet, M., Crawford, S. E., Conner, M. E., et Estes, M. K. (2003). Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. *Vaccine* 21(25-26), 3885-3900.
- Bishop, R. (2009). Discovery of rotavirus: Implications for child health. *J Gastroenterol Hepatol* 24 Suppl 3, S81-85.
- Blutt, S. E., et Conner, M. E. (2007). Rotavirus: to the gut and beyond! *Curr Opin Gastroenterol* 23(1), 39-43.
- Blutt, S. E., Crawford, S. E., Warfield, K. L., Lewis, D. E., Estes, M. K., et Conner, M. E. (2004). The VP7 outer capsid protein of rotavirus induces polyclonal B-cell activation. *J Virol* 78(13), 6974-6981.
- Blutt, S. E., Fenaux, M., Warfield, K. L., Greenberg, H. B., et Conner, M. E. (2006a). Active viremia in rotavirus-infected mice. *J Virol* 80(13), 6702-6705.
- Blutt, S. E., Kirkwood, C. D., Parreno, V., Warfield, K. L., Ciarlet, M., Estes, M. K., Bok, K., Bishop, R. F., et Conner, M. E. (2003). Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet* 362(9394), 1445-1449.
- Blutt, S. E., Warfield, K. L., O'Neal, C. M., Estes, M. K., et Conner, M. E. (2006b). Host, viral, and vaccine factors that determine protective efficacy induced by rotavirus and virus-like particles (VLPs). *Vaccine* 24(8), 1170-1179.
- Boschi-Pinto, C., Velebit, L., et Shibuya, K. (2008). Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *Bull World Health Organ* 86(9), 710-717.
- Boshuizen, J. A., Reimerink, J. H., Korteland-van Male, A. M., van Ham, V. J., Koopmans, M. P., Buller, H. A., Dekker, J., et Einerhand, A. W. (2003). Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. *J Virol* 77(24), 13005-13016.
- Both, G. W., Lockett, L. J., Janardhana, V., Edwards, S. J., Bellamy, A. R., Graham, F. L., Prevec, L., et Andrew, M. E. (1993). Protective immunity to rotavirus-induced

diarrhoea is passively transferred to newborn mice from naive dams vaccinated with a single dose of a recombinant adenovirus expressing rotavirus VP7sc. *Virology* 193(2), 940-950.

- Bourbeau, D., Lau, C. J., Jaime, J., Koty, Z., Zehntner, S. P., Lavoie, G., Mes-Masson, A. M., Nalbantoglu, J., et Massie, B. (2007). Improvement of antitumor activity by gene amplification with a replicating but nondisseminating adenovirus. *Cancer Res* 67(7), 3387-3395.
- Bouvet, J. P., et Fischetti, V. A. (1999). Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. *Infect Immun* 67(6), 2687-2691.
- Bradley, R. R., Lynch, D. M., Iampietro, M. J., Borducchi, E. N., et Barouch, D. H. (2012). Adenovirus serotype 5 neutralizing antibodies target both hexon and fiber following vaccination and natural infection. *J Virol* 86(1), 625-629.
- Braga, C. J., Massis, L. M., Sbrogio-Almeida, M. E., Alencar, B. C., Bargieri, D. Y., Boscardin, S. B., Rodrigues, M. M., et Ferreira, L. C. (2010). CD8+ T cell adjuvant effects of Salmonella FliCd flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. *Vaccine* 28(5), 1373-1382.
- Brandtzaeg, P. (2007). Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 25(30), 5467-5484.
- Buchbinder, S. P., Mehrotra, D. V., Duerr, A., Fitzgerald, D. W., Mogg, R., Li, D., Gilbert, P. B., Lama, J. R., Marmor, M., Del Rio, C., McElrath, M. J., Casimiro, D. R., Gottesdiener, K. M., Chodakewitz, J. A., Corey, L., et Robertson, M. N. (2008). Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* 372(9653), 1881-1893.
- Buesa, J., Raga, J. V., Colomina, J., de Souza, C. O., Munoz, C., et Gil, M. T. (1999). Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize overlapping epitopes in the amino-terminal region of the VP7 glycoprotein. *Virology* 257(2), 424-437.
- Bugaric, A., et Taylor, J. A. (2006). Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 is secreted from the apical surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol* 80(24), 12343-12349.
- Burns, J. W., Siadat-Pajouh, M., Krishnaney, A. A., et Greenberg, H. B. (1996). Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science* 272(5258), 104-107.

- Caballero, S., Abad, F. X., Loisy, F., Le Guyader, F. S., Cohen, J., Pinto, R. M., et Bosch, A. (2004). Rotavirus virus-like particles as surrogates in environmental persistence and inactivation studies. *Appl Environ Microbiol* 70(7), 3904-3909.
- Camacho, A. G., Teixeira, L. H., Bargieri, D. Y., Boscardin, S. B., Soares, I. S., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., et Rodrigues, M. M. (2011). TLR5-dependent immunogenicity of a recombinant fusion protein containing an immunodominant epitope of malarial circumsporozoite protein and the FliC flagellin of *Salmonella Typhimurium*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106 Suppl 1, 167-171.
- Casimiro, D. R., Tang, A., Chen, L., Fu, T. M., Evans, R. K., Davies, M. E., Freed, D. C., Hurni, W., Aste-Amezaga, J. M., Guan, L., Long, R., Huang, L., Harris, V., Nawrocki, D. K., Mach, H., Troutman, R. D., Isopi, L. A., Murthy, K. K., Rice, K., Wilson, K. A., Volkin, D. B., Emini, E. A., et Shiver, J. W. (2003). Vaccine-induced immunity in baboons by using DNA and replication-incompetent adenovirus type 5 vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol* 77(13), 7663-7668.
- Casola, A., Estes, M. K., Crawford, S. E., Ogra, P. L., Ernst, P. B., Garofalo, R. P., et Crowe, S. E. (1998). Rotavirus infection of cultured intestinal epithelial cells induces secretion of CXC and CC chemokines. *Gastroenterology* 114(5), 947-955.
- Casola, A., Garofalo, R. P., Crawford, S. E., Estes, M. K., Mercurio, F., Crowe, S. E., et Brasier, A. R. (2002). Interleukin-8 gene regulation in intestinal epithelial cells infected with rotavirus: role of viral-induced IkappaB kinase activation. *Virology* 298(1), 8-19.
- Cassatella, M. A., Huber, V., Calzetti, F., Margotto, D., Tamassia, N., Peri, G., Mantovani, A., Rivoltini, L., et Tecchio, C. (2006). Interferon-activated neutrophils store a TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) intracellular pool that is readily mobilizable following exposure to proinflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 79(1), 123-132.
- Chang, K. O., Vandal, O. H., Yuan, L., Hodgins, D. C., et Saif, L. J. (2001). Antibody-secreting cell responses to rotavirus proteins in gnotobiotic pigs inoculated with attenuated or virulent human rotavirus. *J Clin Microbiol* 39(8), 2807-2813.
- Charles, M. D., Holman, R. C., Curns, A. T., Parashar, U. D., Glass, R. I., et Bresee, J. S. (2006). Hospitalizations associated with rotavirus gastroenteritis in the United States, 1993-2002. *Pediatr Infect Dis J* 25(6), 489-493.

- Chaung, H. C., Cheng, L. T., Hung, L. H., Tsai, P. C., Skountzou, I., Wang, B., Compans, R. W., et Lien, Y. Y. (2012). Salmonella flagellin enhances mucosal immunity of avian influenza vaccine in chickens. *Vet Microbiol* 157(1-2), 69-77.
- Chen, D., Luongo, C. L., Nibert, M. L., et Patton, J. T. (1999). Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase. *Virology* 265(1), 120-130.
- Chen, S., Guo, D., Guo, B., Liu, J., Shen, Y., Xu, X., Huang, W., et Guo, S. (2012a). Investigation on formulation and preparation of adenovirus encoding human endostatin lyophilized powders. *Int J Pharm* 427(2), 145-152.
- Chen, S. C., Tan, L. B., Huang, L. M., et Chen, K. T. (2012b). Rotavirus infection and the current status of rotavirus vaccines. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 111(4), 183-193.
- Cheng, X., Ming, X., et Croyle, M. A. (2003). PEGylated adenoviruses for gene delivery to the intestinal epithelium by the oral route. *Pharmaceutical research* 20(9), 1444-1451.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., et Felix, G. (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *The Plant cell* 18(2), 465-476.
- Choi, A. H., Basu, M., McNeal, M. M., Bean, J. A., Clements, J. D., et Ward, R. L. (2004). Intranasal administration of an Escherichia coli-expressed codon-optimized rotavirus VP6 protein induces protection in mice. *Protein Expr Purif* 38(2), 205-216.
- Choi, A. H., Basu, M., Rae, M. N., McNeal, M. M., et Ward, R. L. (1998). Particle-bombardment-mediated DNA vaccination with rotavirus VP4 or VP7 induces high levels of serum rotavirus IgG but fails to protect mice against challenge. *Virology* 250(1), 230-240.
- Choi, A. H., Knowlton, D. R., McNeal, M. M., et Ward, R. L. (1997). Particle bombardment-mediated DNA vaccination with rotavirus VP6 induces high levels of serum rotavirus IgG but fails to protect mice against challenge. *Virology* 232(1), 129-138.
- Choi, A. H., McNeal, M. M., Flint, J. A., Basu, M., Lycke, N. Y., Clements, J. D., Bean, J. A., Davis, H. L., McCluskie, M. J., VanCott, J. L., et Ward, R. L. (2002). The level of protection against rotavirus shedding in mice following immunization with a chimeric VP6 protein is dependent on the route and the coadministered adjuvant. *Vaccine* 20(13-14), 1733-1740.

- Choi, N. W., Estes, M. K., et Langridge, W. H. (2005a). Oral immunization with a shiga toxin B subunit: rotavirus NSP4(90) fusion protein protects mice against gastroenteritis. *Vaccine* 23(44), 5168-5176.
- Choi, N. W., Estes, M. K., et Langridge, W. H. (2005b). Synthesis and assembly of a cholera toxin B subunit-rotavirus VP7 fusion protein in transgenic potato. *Mol Biotechnol* 31(3), 193-202.
- Choi, N. W., Estes, M. K., et Langridge, W. H. (2006a). Mucosal immunization with a ricin toxin B subunit-rotavirus NSP4 fusion protein stimulates a Th1 lymphocyte response. *J Biotechnol* 121(2), 272-283.
- Choi, N. W., Estes, M. K., et Langridge, W. H. (2006b). Ricin toxin B subunit enhancement of rotavirus NSP4 immunogenicity in mice. *Viral Immunol* 19(1), 54-63.
- Choi, N. W., Estes, M. K., et Langridge, W. H. (2006c). Synthesis of a ricin toxin B subunit-rotavirus VP7 fusion protein in potato. *Mol Biotechnol* 32(2), 117-128.
- Chung, K. T., et McCrae, M. A. (2011). Regulation of gene expression by the NSP1 and NSP3 non-structural proteins of rotavirus. *Arch Virol* 156(12), 2197-2203.
- Ciarlet, M., Conner, M. E., Finegold, M. J., et Estes, M. K. (2002). Group A rotavirus infection and age-dependent diarrheal disease in rats: a new animal model to study the pathophysiology of rotavirus infection. *J Virol* 76(1), 41-57.
- Ciarlet, M., Crawford, S. E., Barone, C., Bertolotti-Ciarlet, A., Ramig, R. F., Estes, M. K., et Conner, M. E. (1998). Subunit rotavirus vaccine administered parenterally to rabbits induces active protective immunity. *J Virol* 72(11), 9233-9246.
- Ciarlet, M., et Estes, M. K. (2001). Rotavirus and calicivirus infections of the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* 17(1), 10-16.
- Conner, M. E., Zarley, C. D., Hu, B., Parsons, S., Drabinski, D., Greiner, S., Smith, R., Jiang, B., Corsaro, B., Barniak, V., Madore, H. P., Crawford, S., et Estes, M. K. (1996). Virus-like particles as a rotavirus subunit vaccine. *J Infect Dis* 174 Suppl 1, S88-92.
- Cookson, B. T., et Bevan, M. J. (1997). Identification of a natural T cell epitope presented by Salmonella-infected macrophages and recognized by T cells from orally immunized mice. *J Immunol* 158(9), 4310-4319.

- Cooper, C. L., Angel, J. B., Seguin, I., Davis, H. L., et Cameron, D. W. (2008). CPG 7909 adjuvant plus hepatitis B virus vaccination in HIV-infected adults achieves long-term seroprotection for up to 5 years. *Clin Infect Dis* 46(8), 1310-1314.
- Correia, J. B., Patel, M. M., Nakagomi, O., Montenegro, F. M., Germano, E. M., Correia, N. B., Cuevas, L. E., Parashar, U. D., Cunliffe, N. A., et Nakagomi, T. (2010). Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. *J Infect Dis* 201(3), 363-369.
- Corthesy, B., Benureau, Y., Perrier, C., Fourgeux, C., Perez, N., Greenberg, H., et Schwartz-Cornil, I. (2006). Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion. *J Virol* 80(21), 10692-10699.
- Coste, A., Cohen, J., Reinhardt, M., Kraehenbuhl, J. P., et Sirard, J. C. (2001). Nasal immunisation with *Salmonella typhimurium* producing rotavirus VP2 and VP6 antigens stimulates specific antibody response in serum and milk but fails to protect offspring. *Vaccine* 19(30), 4167-4174.
- Coste, A., Sirard, J. C., Johansen, K., Cohen, J., et Kraehenbuhl, J. P. (2000). Nasal immunization of mice with virus-like particles protects offspring against rotavirus diarrhea. *J Virol* 74(19), 8966-8971.
- Coulson, B. S., et Masendycz, P. J. (1990). Measurement of rotavirus-neutralizing coproantibody in children by fluorescent focus reduction assay. *J Clin Microbiol* 28(7), 1652-1654.
- Crawford, S. E., Mukherjee, S. K., Estes, M. K., Lawton, J. A., Shaw, A. L., Ramig, R. F., et Prasad, B. V. (2001). Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J Virol* 75(13), 6052-6061.
- Crawford, S. E., Patel, D. G., Cheng, E., Berkova, Z., Hyser, J. M., Ciarlet, M., Finegold, M. J., Conner, M. E., et Estes, M. K. (2006). Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. *J Virol* 80(10), 4820-4832.
- Croyle, M. A., Patel, A., Tran, K. N., Gray, M., Zhang, Y., Strong, J. E., Feldmann, H., et Kobinger, G. P. (2008). Nasal delivery of an adenovirus-based vaccine bypasses pre-existing immunity to the vaccine carrier and improves the immune response in mice. *PLoS One* 3(10), e3548.
- Cruz, J. L., Zuniga, S., Becares, M., Sola, I., Ceriani, J. E., Juanola, S., Plana, J., et Enjuanes, L. (2010). Vectored vaccines to protect against PRRSV. *Virus Res* 154(1-2), 150-160.

- Cuadros, C., Lopez-Hernandez, F. J., Dominguez, A. L., McClelland, M., et Lustgarten, J. (2004). Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses. *Infect Immun* 72(5), 2810-2816.
- Cunliffe, N. A., et Nakagomi, O. (2005). A critical time for rotavirus vaccines: a review. *Expert Rev Vaccines* 4(4), 521-532.
- Czerkinsky, C., et Holmgren, J. (2012). Mucosal delivery routes for optimal immunization: targeting immunity to the right tissues. *Curr Top Microbiol Immunol* 354, 1-18.
- Daniell, H., Singh, N. D., Mason, H., et Streatfield, S. J. (2009). Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci* 14(12), 669-679.
- Davoodi-Semiromi, A., Samson, N., et Daniell, H. (2009). The green vaccine: A global strategy to combat infectious and autoimmune diseases. *Hum Vaccin* 5(7), 488-493.
- De Zoete, M. R., Kestra, A. M., Wagenaar, J. A., et van Putten, J. P. (2010). Reconstitution of a functional Toll-like receptor 5 binding site in *Campylobacter jejuni* flagellin. *J Biol Chem* 285(16), 12149-12158.
- Dearman, R. J., Caddick, H., Stone, S., Basketter, D. A., et Kimber, I. (2001). Characterization of antibody responses induced in rodents by exposure to food proteins: influence of route of exposure. *Toxicology* 167(3), 217-231.
- Delaney, K. N., Phipps, J. P., Johnson, J. B., et Mizel, S. B. (2010). A recombinant flagellin-poxvirus fusion protein vaccine elicits complement-dependent protection against respiratory challenge with vaccinia virus in mice. *Viral Immunol* 23(2), 201-210.
- Dennehy, P. H. (2008). Rotavirus vaccines: an overview. *Clinical microbiology reviews* 21(1), 198-208.
- Di Martino, C., Basset, C., Ogier, A., Charpilienne, A., Poncet, D., et Kohli, E. (2007). Distribution and phenotype of rotavirus-specific B cells induced during the antigen-driven primary response to 2/6 virus-like particles administered by the intrarectal and the intranasal routes. *J. of leuk biol* 82(4), 821-828.
- Dickey, M., Jamison, L., Michaud, L., Care, M., Bernstein, D. I., et Staat, M. A. (2009). Rotavirus meningoencephalitis in a previously healthy child and a review of the literature. *Pediatr Infect Dis J* 28(4), 318-321.
- Didierlaurent, A., Ferrero, I., Otten, L. A., Dubois, B., Reinhardt, M., Carlsen, H., Blomhoff, R., Akira, S., Kraehenbuhl, J. P., et Sirard, J. C. (2004). Flagellin

promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J Immunol* 172(11), 6922-6930.

- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., et Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303(5663), 1529-1531.
- Dong, J. L., Liang, B. G., Jin, Y. S., Zhang, W. J., et Wang, T. (2005). Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* 339(2), 153-163.
- Donnelly, M. A., et Steiner, T. S. (2002). Two nonadjacent regions in enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin are required for activation of toll-like receptor 5. *J Biol Chem* 277(43), 40456-40461.
- Dormitzer, P. R., Nason, E. B., Prasad, B. V., et Harrison, S. C. (2004). Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* 430(7003), 1053-1058.
- Dormitzer, P. R., Sun, Z. Y., Blixt, O., Paulson, J. C., Wagner, G., et Harrison, S. C. (2002). Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8* core. *J Virol* 76(20), 10512-10517.
- Dunachie, S. J., et Hill, A. V. (2003). Prime-boost strategies for malaria vaccine development. *J Exp Biol* 206(Pt 21), 3771-3779.
- Dus Santos, M. J., et Wigdorovitz, A. (2005). Transgenic plants for the production of veterinary vaccines. *Immunol Cell Biol* 83(3), 229-238.
- Ehrenfeld, E., Modlin, J., et Chumakov, K. (2009). Future of polio vaccines. *Expert Rev Vaccines* 8(7), 899-905.
- El-Attar, L., Oliver, S. L., Mackie, A., Charpilienne, A., Poncet, D., Cohen, J., et Bridger, J. C. (2009). Comparison of the efficacy of rotavirus VLP vaccines to a live homologous rotavirus vaccine in a pig model of rotavirus disease. *Vaccine* 27(24), 3201-3208.
- Estes, M. K., Kang, G., Zeng, C. Q., Crawford, S. E., et Ciarlet, M. (2001). Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. *Novartis Found Symp* 238, 82-96; discussion 96-100.
- Estes, M. K., et Morris, A. P. (1999). A viral enterotoxin. A new mechanism of virus-induced pathogenesis. *Adv Exp Med Biol* 473, 73-82.

- Fenaux, M., Cuadras, M. A., Feng, N., Jaimes, M., et Greenberg, H. B. (2006). Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice. *J Virol* 80(11), 5219-5232.
- Feng, J., Yang, J., Zheng, S., Qiu, Y., et Chai, C. (2011). Silencing of the rotavirus NSP4 protein decreases the incidence of biliary atresia in murine model. *PLoS One* 6(8), e23655.
- Feng, N., Franco, M. A., et Greenberg, H. B. (1997). Murine model of rotavirus infection. *Adv Exp Med Biol* 412, 233-240.
- Feng, N., Jaimes, M. C., Lazarus, N. H., Monak, D., Zhang, C., Butcher, E. C., et Greenberg, H. B. (2006). Redundant role of chemokines CCL25/TECK and CCL28/MEC in IgA+ plasmablast recruitment to the intestinal lamina propria after rotavirus infection. *J Immunol* 176(10), 5749-5759.
- Fischer Walker, C. L., et Black, R. E. (2011). Rotavirus vaccine and diarrhea mortality: quantifying regional variation in effect size. *BMC Public Health* 11 Suppl 3, S16.
- Fleming, F. E., Graham, K. L., Taniguchi, K., Takada, Y., et Coulson, B. S. (2007). Rotavirus-neutralizing antibodies inhibit virus binding to integrins alpha 2 beta 1 and alpha 4 beta 1. *Arch Virol* 152(6), 1087-1101.
- Franco, M. A., Angel, J., et Greenberg, H. B. (2006). Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine* 24(15), 2718-2731.
- Franco, M. A., et Greenberg, H. B. (1997). Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology* 238(2), 169-179.
- Franco, M. A., Prieto, I., Labbe, M., Poncet, D., Borrás-Cuesta, F., et Cohen, J. (1993). An immunodominant cytotoxic T cell epitope on the VP7 rotavirus protein overlaps the H2 signal peptide. *J Gen Virol* 74 (Pt 12), 2579-2586.
- Fu, J., Li, L., et Bouvier, M. (2011). Adenovirus E3-19K proteins of different serotypes and subgroups have similar, yet distinct, immunomodulatory functions toward major histocompatibility class I molecules. *J Biol Chem* 286(20), 17631-17639.
- Fujita, T., Onoguchi, K., Onomoto, K., Hirai, R., et Yoneyama, M. (2007). Triggering antiviral response by RIG-I-related RNA helicases. *Biochimie* 89(6-7), 754-760.
- Ganguly, S., Manicassamy, S., Blackwell, J., Pulendran, B., et Amara, R. R. (2011). Adenovirus type 5 induces vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells and enhances priming of gut-homing CD8 T cells. *Mucosal Immunol* 4(5), 528-538.

- Garcia-Diaz, A., Lopez-Andujar, P., Rodriguez Diaz, J., Montava, R., Torres Barcelo, C., Ribes, J. M., et Buesa, J. (2004). Nasal immunization of mice with a rotavirus DNA vaccine that induces protective intestinal IgA antibodies. *Vaccine* 23(4), 489-498.
- Garcon, N., Segal, L., Tavares, F., et Van Mechelen, M. (2011). The safety evaluation of adjuvants during vaccine development: the AS04 experience. *Vaccine* 29(27), 4453-4459.
- Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., et Madara, J. L. (2001a). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 167(4), 1882-1885.
- Gewirtz, A. T., Simon, P. O., Jr., Schmitt, C. K., Taylor, L. J., Hagedorn, C. H., O'Brien, A. D., Neish, A. S., et Madara, J. L. (2001b). Salmonella typhimurium translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *J Clin Invest* 107(1), 99-109.
- Ghosh, S., et Kobayashi, N. (2011). Whole-genomic analysis of rotavirus strains: current status and future prospects. *Future Microbiol* 6(9), 1049-1065.
- Girard, A., Roques, E., St-Louis, M. C., Massie, B., et Archambault, D. (2013). Expression of human rotavirus chimeric fusion proteins from replicating but non disseminating adenovectors and elicitation of rotavirus-specific Immune responses in mice. *Mol Biotechnol* 54(3), 1010-20.
- Girard, A., Saron, W., Bergeron-Sandoval, L. P., Sarhan, F., et Archambault, D. (2011). Flagellin produced in plants is a potent adjuvant for oral immunization. *Vaccine* 29(38), 6695-6703.
- Gomez-Gomez, L., et Boller, T. (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in plant science* 7(6), 251-256.
- Gomez Corredor, A., et Archambault, D. (2009). The bovine immunodeficiency virus rev protein: identification of a novel lentiviral bipartite nuclear localization signal harboring an atypical spacer sequence. *J Virol* 83(24), 12842-12853.
- Gosselin, E. J., Bitsaktsis, C., Li, Y., et Iglesias, B. V. (2009). Fc receptor-targeted mucosal vaccination as a novel strategy for the generation of enhanced immunity against mucosal and non-mucosal pathogens. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 57(5), 311-323.
- Graham, K. L., Takada, Y., et Coulson, B. S. (2006). Rotavirus spike protein VP5* binds alpha2beta1 integrin on the cell surface and competes with virus for cell binding and infectivity. *J Gen Virol* 87(Pt 5), 1275-1283.

- Granell, A., Fernandez del-Carmen, A., et Orazez, D. (2010). In planta production of plant-derived and non-plant-derived adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 9(8), 843-858.
- Gray, J., et Desselberger, U. (2000). "Rotaviruses : methods and protocols." Humana Press Inc. ed. Methods in molecular medicine (JM Walker, Ed.), 34 Humana Totowa, NJ.
- Grimprel, E. (2010). [Rotavirus vaccination in Europe in 2010]. *Bull Acad Natl Med* 194(8), 1451-1462; discussion 1462-1454.
- Guerrero, C. A., Mendez, E., Zarate, S., Isa, P., Lopez, S., et Arias, C. F. (2000). Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26), 14644-14649.
- Gurunathan, S., Klinman, D. M., et Seder, R. A. (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol* 18, 927-974.
- Haan, L., Verweij, W. R., Holtrop, M., Brands, R., van Scharrenburg, G. J., Palache, A. M., Agsteribbe, E., et Wilschut, J. (2001). Nasal or intramuscular immunization of mice with influenza subunit antigen and the B subunit of Escherichia coli heat-labile toxin induces IgA- or IgG-mediated protective mucosal immunity. *Vaccine* 19(20-22), 2898-2907.
- Halaihel, N., Lievin, V., Ball, J. M., Estes, M. K., Alvarado, F., et Vasseur, M. (2000). Direct inhibitory effect of rotavirus NSP4(114-135) peptide on the Na(+)-D-glucose symporter of rabbit intestinal brush border membrane. *J Virol* 74(20), 9464-9470.
- Hansen, J. E., Lund, O., Tolstrup, N., Gooley, A. A., Williams, K. L., et Brunak, S. (1998). NetOglyc: prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility. *Glycoconj J* 15(2), 115-130.
- He, J., Wang, J., Jiang, X., Wang, D., Wen, L., Dong, J., Qu, J., et Hong, T. (2002). [Expression of the main structural antigen VP6 of human rotavirus by recombinant adenovirus and immune responses induced in vivo]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 16(2), 109-113.
- Heath, R. R., Stagg, S., Xu, F., et McCrae, M. A. (1997). Mapping of the target antigens of the rotavirus-specific cytotoxic T cell response. *J Gen Virol* 78 (Pt 5), 1065-1075.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., et Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303(5663), 1526-1529.
- Herrmann, J. E. (2006). DNA vaccines against enteric infections. *Vaccine* 24(18), 3705-3708.

- Herrmann, J. E., Chen, S. C., Fynan, E. F., Santoro, J. C., Greenberg, H. B., Wang, S., et Robinson, H. L. (1996). Protection against rotavirus infections by DNA vaccination. *J Infect Dis* 174 Suppl 1, S93-97.
- Herrmann, J. E., Chen, S. C., Jones, D. H., Tinsley-Bown, A., Fynan, E. F., Greenberg, H. B., et Farrar, G. H. (1999). Immune responses and protection obtained by oral immunization with rotavirus VP4 and VP7 DNA vaccines encapsulated in microparticles. *Virology* 259(1), 148-153.
- Hertel, P. M., et Estes, M. K. (2012). Rotavirus and biliary atresia: can causation be proven? *Curr Opin Gastroenterol* 28(1), 10-17.
- Hong, S. H., Byun, Y. H., Nguyen, C. T., Kim, S. Y., Seong, B. L., Park, S., Woo, G. J., Yoon, Y., Koh, J. T., Fujihashi, K., Rhee, J. H., et Lee, S. E. (2012). Intranasal administration of a flagellin-adjuvanted inactivated influenza vaccine enhances mucosal immune responses to protect mice against lethal infection. *Vaccine* 30(2), 466-474.
- Hong, S. S., Habib, N. A., Franqueville, L., Jensen, S., et Boulanger, P. A. (2003). Identification of adenovirus (ad) penton base neutralizing epitopes by use of sera from patients who had received conditionally replicative ad (add1520) for treatment of liver tumors. *J Virol* 77(19), 10366-10375.
- Honko, A. N., Sriranganathan, N., Lees, C. J., et Mizel, S. B. (2006). Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect Immun* 74(2), 1113-1120.
- Horng, T., Barton, G. M., Flavell, R. A., et Medzhitov, R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420(6913), 329-333.
- Hoshino, Y., et Kapikian, A. Z. (1996). Classification of rotavirus VP4 and VP7 serotypes. *Arch Virol Suppl* 12, 99-111.
- Houghton, M. (2011). Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against the hepatitis C viruses. *Immunol Rev* 239(1), 99-108.
- Huang, J. A., Wang, L., Firth, S., Phelps, A., Reeves, P., et Holmes, I. (2000). Rotavirus VP7 epitope mapping using fragments of VP7 displayed on phages. *Vaccine* 18(21), 2257-2265.
- Huang, S., Endo, R. I., et Nemerow, G. R. (1995). Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. *Journal of virology* 69(4), 2257-2263.

- Huarte, E., Larrea, E., Hernandez-Alcoceba, R., Alfaro, C., Murillo, O., Arina, A., Tirapu, I., Azpilicueta, A., Hervás-Stubbs, S., Bortolanza, S., Perez-Gracia, J. L., Civeira, M. P., Prieto, J., Riezu-Boj, J. I., et Melero, I. (2006). Recombinant adenoviral vectors turn on the type I interferon system without inhibition of transgene expression and viral replication. *Mol Ther* 14(1), 129-138.
- Huleatt, J. W., Jacobs, A. R., Tang, J., Desai, P., Kopp, E. B., Huang, Y., Song, L., Nakaar, V., et Powell, T. J. (2007). Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine* 25(4), 763-775.
- Huleatt, J. W., Nakaar, V., Desai, P., Huang, Y., Hewitt, D., Jacobs, A., Tang, J., McDonald, W., Song, L., Evans, R. K., Umlauf, S., Tussey, L., et Powell, T. J. (2008). Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine* 26(2), 201-214.
- Ijaz, M. K., Nur, E. K. M. S., Dar, F. K., Uduman, S., Redmond, M. J., Attah-Poku, S. K., Dent, D., et Babiuk, L. A. (1998). Inhibition of rotavirus infection in vitro and in vivo by a synthetic peptide from VP4. *Vaccine* 16(9-10), 916-920.
- Inka Borchers, A. M., Gonzalez-Rabade, N., et Gray, J. C. (2012). Increased accumulation and stability of rotavirus VP6 protein in tobacco chloroplasts following changes to the 5' untranslated region and the 5' end of the coding region. *Plant Biotechnol J* 10(4), 422-34.
- Iosef, C., Van Nguyen, T., Jeong, K., Bengtsson, K., Morein, B., Kim, Y., Chang, K. O., Azevedo, M. S., Yuan, L., Nielsen, P., et Saif, L. J. (2002). Systemic and intestinal antibody secreting cell responses and protection in gnotobiotic pigs immunized orally with attenuated Wa human rotavirus and Wa 2/6-rotavirus-like-particles associated with immunostimulating complexes. *Vaccine* 20(13-14), 1741-1753.
- Istrate, C., Hinkula, J., Charpilienne, A., Poncet, D., Cohen, J., Svensson, L., et Johansen, K. (2008). Parenteral administration of RF 8-2/6/7 rotavirus-like particles in a one-dose regimen induce protective immunity in mice. *Vaccine* 26(35), 4594-4601.
- Iturriza-Gomara, M., Auchterlonie, I. A., Zaw, W., Molyneaux, P., Desselberger, U., et Gray, J. (2002). Rotavirus gastroenteritis and central nervous system (CNS) infection: characterization of the VP7 and VP4 genes of rotavirus strains isolated from paired fecal and cerebrospinal fluid samples from a child with CNS disease. *J Clin Microbiol* 40(12), 4797-4799.

- Jaimes, M. C., Feng, N., et Greenberg, H. B. (2005). Characterization of homologous and heterologous rotavirus-specific T-cell responses in infant and adult mice. *J Virol* 79(8), 4568-4579.
- Jiang, B., Estes, M. K., Barone, C., Barniak, V., O'Neal, C. M., Ottaiano, A., Madore, H. P., et Conner, M. E. (1999). Heterotypic protection from rotavirus infection in mice vaccinated with virus-like particles. *Vaccine* 17(7-8), 1005-1013.
- Jiang, B., Gentsch, J. R., et Glass, R. I. (2002). The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin Infect Dis* 34(10), 1351-1361.
- Jiang, B., Gentsch, J. R., et Glass, R. I. (2008). Inactivated rotavirus vaccines: a priority for accelerated vaccine development. *Vaccine* 26(52), 6754-6758.
- Jiang, V., Jiang, B., Tate, J., Parashar, U. D., et Patel, M. M. (2010). Performance of rotavirus vaccines in developed and developing countries. *Hum Vaccin* 6(7), 532-542.
- Jogler, C., Hoffmann, D., Theegarten, D., Grunwald, T., Uberla, K., et Wildner, O. (2006). Replication properties of human adenovirus in vivo and in cultures of primary cells from different animal species. *J Virol* 80(7), 3549-3558.
- Johansen, K., Schroder, U., et Svensson, L. (2003). Immunogenicity and protective efficacy of a formalin-inactivated rotavirus vaccine combined with lipid adjuvants. *Vaccine* 21(5-6), 368-375.
- Juskewitch, J. E., Tapia, C. J., et Windebank, A. J. (2010). Lessons from the Salk polio vaccine: methods for and risks of rapid translation. *Clin Transl Sci* 3(4), 182-185.
- Kajal, H., et Misra, A. (2011). Preparation of tetanus toxoid and ovalbumin loaded gliadin nanoparticles for oral immunization. *J Biomed Nanotechnol* 7(1), 211-212.
- Kamohara, H., Matsuyama, W., Shimozaoto, O., Abe, K., Galligan, C., Hashimoto, S., Matsushima, K., et Yoshimura, T. (2004). Regulation of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptor expression in human neutrophils. *Immunology* 111(2), 186-194.
- Kane, N. A., Agharbaoui, Z., Diallo, A. O., Adam, H., Tominaga, Y., Ouellet, F., et Sarhan, F. (2007). TaVRT2 represses transcription of the wheat vernalization gene TaVRN1. *Plant J* 51(4), 670-680.
- Kantele, A., Hakkinen, M., Moldoveanu, Z., Lu, A., Savilahti, E., Alvarez, R. D., Michalek, S., et Mestecky, J. (1998). Differences in immune responses induced by oral and rectal immunizations with *Salmonella typhi* Ty21a: evidence for

- compartmentalization within the common mucosal immune system in humans. *Infect Immun* 66(12), 5630-5635.
- Khanam, S., Rajendra, P., Khanna, N., et Swaminathan, S. (2007). An adenovirus prime/plasmid boost strategy for induction of equipotent immune responses to two dengue virus serotypes. *BMC Biotechnol* 7, 10.
- Khodabandehloo, M., Shamsi Shahrabadi, M., Keyvani, H., et Bambai, B. (2009). Cloning and expression of simian rotavirus spike protein (VP4) in insect cells by baculovirus expression system. *Iran Biomed J* 13(1), 9-18.
- Kim, I. S., Trask, S. D., Babyonyshev, M., Dormitzer, P. R., et Harrison, S. C. (2010). Effect of mutations in VP5 hydrophobic loops on rotavirus cell entry. *J Virol* 84(12), 6200-6207.
- Kirkwood, C. D. (2010). Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. *J Inf Dis* 202 Suppl, S43-48.
- Kool, M., Petrilli, V., De Smedt, T., Rolaz, A., Hammad, H., van Nimwegen, M., Bergen, I. M., Castillo, R., Lambrecht, B. N., et Tschopp, J. (2008). Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* 181(6), 3755-3759.
- Kovacs-Nolan, J., et Mine, Y. (2006). Tandem copies of a human rotavirus VP8 epitope can induce specific neutralizing antibodies in BALB/c mice. *Biochim Biophys Acta* 1760(12), 1884-1893.
- Kovacs-Nolan, J., Yoo, D., et Mine, Y. (2003). Fine mapping of sequential neutralization epitopes on the subunit protein VP8 of human rotavirus. *Biochem J* 376(Pt 1), 269-275.
- Kozlowski, P. A., Cu-Uvin, S., Neutra, M. R., et Flanigan, T. P. (1997). Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infect Immun* 65(4), 1387-1394.
- Krajcsi, P., Dimitrov, T., Hermiston, T. W., Tollefson, A. E., Ranheim, T. S., Vande Pol, S. B., Stephenson, A. H., et Wold, W. S. (1996). The adenovirus E3-14.7K protein and the E3-10.4K/14.5K complex of proteins, which independently inhibit tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis, also independently inhibit TNF-induced release of arachidonic acid. *J Virol* 70(8), 4904-4913.
- Kunkel, E. J., Kim, C. H., Lazarus, N. H., Vierra, M. A., Soler, D., Bowman, E. P., et Butcher, E. C. (2003). CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. *J Clin Invest* 111(7), 1001-1010.

- Lamkanfi, M., Kanneganti, T. D., Franchi, L., et Nunez, G. (2007). Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 82(2), 220-225.
- Landry, N., Ward, B. J., Trepanier, S., Montomoli, E., Dargis, M., Lapini, G., et Vezina, L. P. (2010). Preclinical and clinical development of plant-made virus-like particle vaccine against avian H5N1 influenza. *PLoS One* 5(12), e15559.
- Lanza, S. R., Menin, A., Ertl, H. C., Bafica, A., et Pinto, A. R. (2010). Simian recombinant adenovirus delivered by the mucosal route modulates gammadelta T cells from murine genital tract. *Vaccine* 28(29), 4600-4608.
- Lasaro, M. O., et Ertl, H. C. (2009). New insights on adenovirus as vaccine vectors. *Mol Ther* 17(8), 1333-1339.
- Lavelle, E. C., Grant, G., Pusztai, A., Pfuller, U., et O'Hagan, D. T. (2001). The identification of plant lectins with mucosal adjuvant activity. *Immunology* 102(1), 77-86.
- Lawton, J. A., Estes, M. K., et Prasad, B. V. (2000). Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Adv Virus Res* 55, 185-229.
- Lee, S., Belitsky, B. R., Brinker, J. P., Kerstein, K. O., Brown, D. W., Clements, J. D., Keusch, G. T., Tzipori, S., Sonenshein, A. L., et Herrmann, J. E. (2010). Development of a *Bacillus subtilis*-based rotavirus vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 17(11), 1647-1655.
- Lee, S. E., Kim, S. Y., Jeong, B. C., Kim, Y. R., Bae, S. J., Ahn, O. S., Lee, J. J., Song, H. C., Kim, J. M., Choy, H. E., Chung, S. S., Kweon, M. N., et Rhee, J. H. (2006). A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. *Infect Immun* 74(1), 694-702.
- Leen, A. M., Christin, A., Khalil, M., Weiss, H., Gee, A. P., Brenner, M. K., Heslop, H. E., Rooney, C. M., et Bollard, C. M. (2008). Identification of hexon-specific CD4 and CD8 T-cell epitopes for vaccine and immunotherapy. *J Virol* 82(1), 546-554.
- Lemiale, F., Kong, W. P., Akyurek, L. M., Ling, X., Huang, Y., Chakrabarti, B. K., Eckhaus, M., et Nabel, G. J. (2003). Enhanced mucosal immunoglobulin A response of intranasal adenoviral vector human immunodeficiency virus vaccine and localization in the central nervous system. *J Virol* 77(18), 10078-10087.
- Lentz, E. M., Mozgovoj, M. V., Bellido, D., Dus Santos, M. J., Wigdorovitz, A., et Bravo-Almonacid, F. F. (2011). VP8* antigen produced in tobacco transplastomic plants confers protection against bovine rotavirus infection in a suckling mouse model. *J Biotechnol* 156(2), 100-107.

- Lesokhin, A. M., Delgado-Lopez, F., et Horwitz, M. S. (2002). Inhibition of chemokine expression by adenovirus early region three (E3) genes. *J Virol* 76(16), 8236-8243.
- Leung, A. K., Kellner, J. D., et Davies, H. D. (2005). Rotavirus gastroenteritis. *Adv Ther* 22(5), 476-487.
- Li, J., Guo, J., Su, Z., Hu, M., Liu, W., et Wei, Q. (2011). Calcineurin subunit B activates dendritic cells and acts as a cancer vaccine adjuvant. *Int Immunol* 23(5), 327-334.
- Li, J. T., Fei, L., Mou, Z. R., Wei, J., Tang, Y., He, H. Y., Wang, L., et Wu, Y. Z. (2006). Immunogenicity of a plant-derived edible rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations. *Virology* 356(1-2), 171-178.
- Li, Y., Jiang, Q. F., Wang, J. W., Chen, Y., Wang, M., Li, C. H., Zhang, C. H., Dai, C. B., Yu, X. P., Dai, J. J., Li, Q. H., et Hong, T. (2004). [Preliminary study of immunity and safety of recombinant adenovirus expressing rotavirus structural proteins in rhesus monkeys]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 84(23), 2002-2006.
- Li, Y. J., Ma, G. P., Li, G. W., Qiao, X. Y., Ge, J. W., Tang, L. J., Liu, M., et Liu, L. W. (2010). Oral vaccination with the porcine rotavirus VP4 outer capsid protein expressed by *Lactococcus lactis* induces specific antibody production. *J Biomed Biotechnol* 2010, 708460.
- Liang, X., Zhang, Y., Xu, W., Wen, N., Zuo, S., Lee, L. A., et Yu, J. (2006). An outbreak of poliomyelitis caused by type 1 vaccine-derived poliovirus in China. *J Infect Dis* 194(5), 545-551.
- Lightfield, K. L., Persson, J., Brubaker, S. W., Witte, C. E., von Moltke, J., Dunipace, E. A., Henry, T., Sun, Y. H., Cado, D., Dietrich, W. F., Monack, D. M., Tsolis, R. M., et Vance, R. E. (2008). Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol* 9(10), 1171-1178.
- Limaye, A., Koya, V., Samsam, M., et Daniell, H. (2006). Receptor-mediated oral delivery of a bioencapsulated green fluorescent protein expressed in transgenic chloroplasts into the mouse circulatory system. *FASEB J* 20(7), 959-961.
- Lin, S. W., Cun, A. S., Harris-McCoy, K., et Ertl, H. C. (2007). Intramuscular rather than oral administration of replication-defective adenoviral vaccine vector induces specific CD8⁺ T cell responses in the gut. *Vaccine* 25(12), 2187-2193.
- Liu, J., Ewald, B. A., Lynch, D. M., Denholtz, M., Abbink, P., Lemckert, A. A., Carville, A., Mansfield, K. G., Havenga, M. J., Goudsmit, J., et Barouch, D. H. (2008). Magnitude and phenotype of cellular immune responses elicited by recombinant

- adenovirus vectors and heterologous prime-boost regimens in rhesus monkeys. *J Virol* 82(10), 4844-4852.
- Liu, M. A. (2010). Immunologic basis of vaccine vectors. *Immunity* 33(4), 504-515.
- Liu, X., Yang, T., Sun, Q. M., et Sun, M. S. (2005). Efficient intranasal immunization of newborn mice with recombinant adenovirus expressing rotavirus protein VP4 against oral rotavirus infection. *Acta Virol* 49(1), 17-22.
- Loy, A. L., Allison, G., Arias, C. F., et Verma, N. K. (1999). Immune response to rotavirus VP4 expressed in an attenuated strain of *Shigella flexneri*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25(3), 283-288.
- Ludert, J. E., Ruiz, M. C., Hidalgo, C., et Liprandi, F. (2002). Antibodies to rotavirus outer capsid glycoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsidation. *J Virol* 76(13), 6643-6651.
- Lugade, A. A., Kalathil, S., Heald, J. L., et Thanavala, Y. (2010). Transgenic plant-based oral vaccines. *Immunol Invest* 39(4-5), 468-482.
- Macdonald, T. T., et Monteleone, G. (2005). Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 307(5717), 1920-1925.
- Madore, H. P., Estes, M. K., Zarley, C. D., Hu, B., Parsons, S., Digravio, D., Greiner, S., Smith, R., Jiang, B., Corsaro, B., Barniak, V., Crawford, S., et Conner, M. E. (1999). Biochemical and immunologic comparison of virus-like particles for a rotavirus subunit vaccine. *Vaccine* 17(19), 2461-2471.
- Mahida, Y. R. (2000). The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflam Bowel Dis* 6(1), 21-33.
- Marelli, B., Perez, A. R., Banchio, C., de Mendoza, D., et Magni, C. (2011). Oral immunization with live *Lactococcus lactis* expressing rotavirus VP8 subunit induces specific immune response in mice. *J Virol Methods* 175(1), 28-37.
- Mariathasan, S., et Monack, D. M. (2007). Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 7(1), 31-40.
- Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D. M., Vucic, D., French, D. M., Lee, W. P., Roose-Girma, M., Erickson, S., et Dixit, V. M. (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430(6996), 213-218.

- Martin, C. A., et Dorf, M. E. (1990). Interleukin-6 production by murine macrophage cell lines P388D1 and J774A.1: stimulation requirements and kinetics. *Cellular immunology* 128(2), 555-568.
- Martinon, F., et Tschopp, J. (2004). Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 117(5), 561-574.
- Mascarell, L., Zimmer, A., Van Overtvelt, L., Tourdot, S., et Moingeon, P. (2011). Induction of allergen-specific tolerance via mucosal routes. *Curr Top Microbiol Immunol* 352, 85-105.
- Mascola, J. R., Sambor, A., Beaudry, K., Santra, S., Welcher, B., Louder, M. K., Vancott, T. C., Huang, Y., Chakrabarti, B. K., Kong, W. P., Yang, Z. Y., Xu, L., Montefiori, D. C., Nabel, G. J., et Letvin, N. L. (2005). Neutralizing antibodies elicited by immunization of monkeys with DNA plasmids and recombinant adenoviral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J Virol* 79(2), 771-779.
- Mason, K. L., Huffnagle, G. B., Noverr, M. C., et Kao, J. Y. (2008). Overview of gut immunology. *Adv Exp Med Biol* 635, 1-14.
- Mast, T. C., Kierstead, L., Gupta, S. B., Nikas, A. A., Kallas, E. G., Novitsky, V., Mbewe, B., Pitisuttithum, P., Schechter, M., Vardas, E., Wolfe, N. D., Aste-Amezaga, M., Casimiro, D. R., Coplan, P., Straus, W. L., et Shiver, J. W. (2010). International epidemiology of human pre-existing adenovirus (Ad) type-5, type-6, type-26 and type-36 neutralizing antibodies: correlates of high Ad5 titers and implications for potential HIV vaccine trials. *Vaccine* 28(4), 950-957.
- Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B. V., Cohen, J., et Rey, F. A. (2001). Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *Embo J* 20(7), 1485-1497.
- Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A., et Seya, T. (2003). Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171(6), 3154-3162.
- McDermott, P. F., Ciacchi-Woolwine, F., Snipes, J. A., et Mizel, S. B. (2000). High-affinity interaction between gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation. *Infect Immun* 68(10), 5525-5529.
- McElrath, M. J., De Rosa, S. C., Moodie, Z., Dubey, S., Kierstead, L., Janes, H., Defawe, O. D., Carter, D. K., Hural, J., Akondy, R., Buchbinder, S. P., Robertson, M. N., Mehrotra, D. V., Self, S. G., Corey, L., Shiver, J. W., et Casimiro, D. R. (2008). HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet* 372(9653), 1894-1905.

- McEwen, J., Levi, R., Horwitz, R. J., et Arnon, R. (1992). Synthetic recombinant vaccine expressing influenza haemagglutinin epitope in *Salmonella* flagellin leads to partial protection in mice. *Vaccine* 10(6), 405-411.
- McNeal, M. M., Basu, M., Bean, J. A., Clements, J. D., Lycke, N. Y., Ramne, A., Lowenadler, B., Choi, A. H., et Ward, R. L. (2007). Intrarectal immunization of mice with VP6 and either LT(R192G) or CTA1-DD as adjuvant protects against fecal rotavirus shedding after EDIM challenge. *Vaccine* 25(33), 6224-6231.
- McNeal, M. M., Stone, S. C., Basu, M., Bean, J. A., Clements, J. D., Hendrickson, B. A., Choi, A. H., et Ward, R. L. (2006). Protection against rotavirus shedding after intranasal immunization of mice with a chimeric VP6 protein does not require intestinal IgA. *Virology* 346(2), 338-347.
- McSorley, S. J., Ehst, B. D., Yu, Y., et Gewirtz, A. T. (2002). Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4+ T cells in vivo. *J Immunol* 169(7), 3914-3919.
- Means, T. K., Hayashi, F., Smith, K. D., Aderem, A., et Luster, A. D. (2003). The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol* 170(10), 5165-5175.
- Medici, M. C., Abelli, L. A., Guerra, P., Dodi, I., Dettori, G., et Chezzi, C. (2011). Case report: detection of rotavirus RNA in the cerebrospinal fluid of a child with rotavirus gastroenteritis and meningism. *J Med Virol* 83(9), 1637-1640.
- Merrell, D. S., et Falkow, S. (2004). Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis. *Nature* 430(6996), 250-256.
- Miao, E. A., Andersen-Nissen, E., Warren, S. E., et Aderem, A. (2007). TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol* 29(3), 275-288.
- Minodier, P., Noel, G., Blanc, P., Uters, M., Retornaz, K., et Garnier, J. M. (2007). [Rotavirus vaccines and the risk of intussusception]. *Arch Pediatr* 14(6), 618-620.
- Minor, P. D. (2012). The polio-eradication programme and issues of the end game. *J Gen Virol* 93(Pt 3), 457-474.
- Mirazimi, A., et Svensson, L. (2000). ATP is required for correct folding and disulfide bond formation of rotavirus VP7. *J Virol* 74(17), 8048-8052.
- Mishra, N., Goyal, A. K., Tiwari, S., Paliwal, R., Paliwal, S. R., Vaidya, B., Mangal, S., Gupta, M., Dube, D., Mehta, A., et Vyas, S. P. (2010). Recent advances in mucosal

- delivery of vaccines: role of mucoadhesive/biodegradable polymeric carriers. *Expert Opin Ther Pat* 20(5), 661-679.
- Mizel, S. B., et Bates, J. T. (2010). Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J Immunol* 185(10), 5677-5682.
- Mizel, S. B., Graff, A. H., Sriranganathan, N., Ervin, S., Lees, C. J., Lively, M. O., Hantgan, R. R., Thomas, M. J., Wood, J., et Bell, B. (2009). Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates. *Clin Vaccine Immunol* 16(1), 21-28.
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 22(2), 240-273, Table of Contents.
- Monnier, N., Higo-Moriguchi, K., Sun, Z. Y., Prasad, B. V., Taniguchi, K., et Dormitzer, P. R. (2006). High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain. *J Virol* 80(3), 1513-1523.
- Montero, H., Arias, C. F., et Lopez, S. (2006). Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol* 80(18), 9031-9038.
- Mossel, E. C., et Ramig, R. F. (2002). Rotavirus genome segment 7 (NSP3) is a determinant of extraintestinal spread in the neonatal mouse. *J Virol* 76(13), 6502-6509.
- Mossel, E. C., et Ramig, R. F. (2003). A lymphatic mechanism of rotavirus extraintestinal spread in the neonatal mouse. *J Virol* 77(22), 12352-12356.
- Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3(4), 331-341.
- Mowat, A. M., Parker, L. A., Beacock-Sharp, H., Millington, O. R., et Chirido, F. (2004). Oral tolerance: overview and historical perspectives. *Ann N Y Acad Sci* 1029, 1-8.
- Moynagh, P. N. (2005). TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol* 26(9), 469-476.
- Mullick, A., Xu, Y., Warren, R., Koutroumanis, M., Guilbault, C., Broussau, S., Malenfant, F., Bourget, L., Lamoureux, L., Lo, R., Caron, A. W., Pilote, A., et Massie, B. (2006). The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC Biotechnol* 6, 43.
- Munos, M. K., Walker, C. L., et Black, R. E. (2010). The effect of rotavirus vaccine on diarrhoea mortality. *Int J Epidemiol* 39 Suppl 1, i56-62.

- Murad, Y. M., et Clay, T. M. (2009). CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists: therapeutic applications in cancer. *BioDrugs* 23(6), 361-375.
- Muruve, D. A. (2004). The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 15(12), 1157-1166.
- Nakagawa, S., Massie, B., et Hawley, R. G. (2001). Tetracycline-regulatable adenovirus vectors: pharmacologic properties and clinical potential. *Eur J Pharm Sci* 13(1), 53-60.
- Nanda, A., Lynch, D. M., Goudsmit, J., Lemckert, A. A., Ewald, B. A., Sumida, S. M., Truitt, D. M., Abbink, P., Kishko, M. G., Gorgone, D. A., Lifton, M. A., Shen, L., Carville, A., Mansfield, K. G., Havenga, M. J., et Barouch, D. H. (2005). Immunogenicity of recombinant fiber-chimeric adenovirus serotype 35 vector-based vaccines in mice and rhesus monkeys. *J Virol* 79(22), 14161-14168.
- Narvaez, C. F., Angel, J., et Franco, M. A. (2005). Interaction of rotavirus with human myeloid dendritic cells. *J Virol* 79(23), 14526-14535.
- Neutra, M. R., et Kozlowski, P. A. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* 6(2), 148-158.
- Nguyen, C. T., Kim, S. Y., Kim, M. S., Lee, S. E., et Rhee, J. H. (2011). Intranasal immunization with recombinant PspA fused with a flagellin enhances cross-protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Vaccine* 29(34), 5731-5739.
- Nguyen, T. V., Iosef, C., Jeong, K., Kim, Y., Chang, K. O., Lovgren-Bengtsson, K., Morein, B., Azevedo, M. S., Lewis, P., Nielsen, P., Yuan, L., et Saif, L. J. (2003). Protection and antibody responses to oral priming by attenuated human rotavirus followed by oral boosting with 2/6-rotavirus-like particles with immunostimulating complexes in gnotobiotic pigs. *Vaccine* 21(25-26), 4059-4070.
- Nguyen, T. V., Yuan, L., Azevedo, M. S., Jeong, K. I., Gonzalez, A. M., Iosef, C., Lovgren-Bengtsson, K., Morein, B., Lewis, P., et Saif, L. J. (2006a). High titers of circulating maternal antibodies suppress effector and memory B-cell responses induced by an attenuated rotavirus priming and rotavirus-like particle-immunostimulating complex boosting vaccine regimen. *Clin Vaccine Immunol* 13(4), 475-485.
- Nguyen, T. V., Yuan, L., MS, P. A., Jeong, K. I., Gonzalez, A. M., Iosef, C., Lovgren-Bengtsson, K., Morein, B., Lewis, P., et Saif, L. J. (2006b). Low titer maternal antibodies can both enhance and suppress B cell responses to a combined live attenuated human rotavirus and VLP-ISCOM vaccine. *Vaccine* 24(13), 2302-2316.

- Nociari, M., Ocheretina, O., Schoggins, J. W., et Falck-Pedersen, E. (2007). Sensing infection by adenovirus: Toll-like receptor-independent viral DNA recognition signals activation of the interferon regulatory factor 3 master regulator. *J Virol* 81(8), 4145-4157.
- O'Neal, C. M., Crawford, S. E., Estes, M. K., et Conner, M. E. (1997). Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity. *J Virol* 71(11), 8707-8717.
- O'Neal, C. M., Harriman, G. R., et Conner, M. E. (2000). Protection of the villus epithelial cells of the small intestine from rotavirus infection does not require immunoglobulin A. *J Virol* 74(9), 4102-4109.
- Offit, P. A., et Dudzik, K. I. (1988). Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes cross-react with target cells infected with different rotavirus serotypes. *J Virol* 62(1), 127-131.
- Ogata, H., et Hibi, T. (2003). Cytokine and anti-cytokine therapies for inflammatory bowel disease. *Current pharmaceutical design* 9(14), 1107-1113.
- Ogura, Y., Sutterwala, F. S., et Flavell, R. A. (2006). The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell* 126(4), 659-662.
- Oliveira, F. M., Santos, E. M., Mota-Santos, T. A., Ruiz-De-Souza, V., et Gontijo, C. M. (2002). Covalent coupling of palmitate to ovalbumin inhibits and blocks the induction of oral tolerance. *Scand J Immunol* 55(6), 570-576.
- Oliveira, F. M., Silva-Neto, A. F., Silva, C. A., et Gontijo, C. M. (1998). Coupling of palmitate to ovalbumin inhibits the induction of oral tolerance. *Braz J Med Biol Res* 31(11), 1421-1424.
- Oualikene, W., Lamoureux, L., Weber, J. M., et Massie, B. (2000). Protease-deleted adenovirus vectors and complementing cell lines: potential applications of single-round replication mutants for vaccination and gene therapy. *Hum Gene Ther* 11(9), 1341-1353.
- Palombo, E. A., Bugg, H. C., et Bishop, R. F. (1998). Characterisation of rearranged NSP5 gene of a human rotavirus. *Acta Virol* 42(1), 55-59.
- Parashar, U. D., Bresee, J. S., Gentsch, J. R., et Glass, R. I. (1998). Rotavirus. *Emerg Infect Dis* 4(4), 561-570.
- Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresse, J. S., et Glass, R. I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12(2), 304-306.

- Parashar, U. D., et Glass, R. I. (2006). Public health. Progress toward rotavirus vaccines. *Science* 312(5775), 851-852.
- Parez, N. (2007). Rotavirus gastroenteritis: Why to back up the development of new vaccines? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31(2-3), 253-69.
- Parez, N., Fourgeux, C., Mohamed, A., Dubuquoy, C., Pillot, M., Dehee, A., Charpilienne, A., Poncet, D., Schwartz-Cornil, I., et Garbarg-Chenon, A. (2006). Rectal immunization with rotavirus virus-like particles induces systemic and mucosal humoral immune responses and protects mice against rotavirus infection. *J Virol* 80(4), 1752-1761.
- Paris, R. M., Kim, J. H., Robb, M. L., et Michael, N. L. (2010). Prime-boost immunization with poxvirus or adenovirus vectors as a strategy to develop a protective vaccine for HIV-1. *Expert Rev Vaccines* 9(9), 1055-1069.
- Parreno, V., Hodgins, D. C., de Arriba, L., Kang, S. Y., Yuan, L., Ward, L. A., To, T. L., et Saif, L. J. (1999). Serum and intestinal isotype antibody responses to Wa human rotavirus in gnotobiotic pigs are modulated by maternal antibodies. *J Gen Virol* 80 (Pt 6), 1417-1428.
- Patel, A., Tikoo, S., et Kobinger, G. (2010). A porcine adenovirus with low human seroprevalence is a promising alternative vaccine vector to human adenovirus 5 in an H5N1 virus disease model. *PLoS One* 5(12), e15301.
- Patterson, L. J., Kuate, S., Daltabuit-Test, M., Li, Q., Xiao, P., McKinnon, K., DiPasquale, J., Cristillo, A., Venzon, D., Haase, A., et Robert-Guroff, M. (2012). Replicating adenovirus-simian immunodeficiency virus (SIV) vectors efficiently prime SIV-specific systemic and mucosal immune responses by targeting myeloid dendritic cells and persisting in rectal macrophages, regardless of immunization route. *Clin Vaccine Immunol* 19(5), 629-637.
- Peng, B., Wang, L. R., Gomez-Roman, V. R., Davis-Warren, A., Montefiori, D. C., Kalyanaraman, V. S., Venzon, D., Zhao, J., Kan, E., Rowell, T. J., Murthy, K. K., Srivastava, I., Barnett, S. W., et Robert-Guroff, M. (2005). Replicating rather than nonreplicating adenovirus-human immunodeficiency virus recombinant vaccines are better at eliciting potent cellular immunity and priming high-titer antibodies. *J Virol* 79(16), 10200-10209.
- Perez, C. A., Eichwald, C., Burrone, O., et Mendoza, D. (2005). Rotavirus vp7 antigen produced by *Lactococcus lactis* induces neutralizing antibodies in mice. *J Appl Microbiol* 99(5), 1158-1164.

- Perez Filgueira, D. M., Mozgovoij, M., Wigdorovitz, A., Dus Santos, M. J., Parreno, V., Trono, K., Fernandez, F. M., Carrillo, C., Babiuk, L. A., Morris, T. J., et Borca, M. V. (2004). Passive protection to bovine rotavirus (BRV) infection induced by a BRV VP8* produced in plants using a TMV-based vector. *Arch Virol* 149(12), 2337-2348.
- Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Estes, M. K., et Prasad, B. V. (2006). Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol* 309, 189-219.
- Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Roberts, E., Estes, M. K., et Prasad, B. V. (2005). pH-induced conformational change of the rotavirus VP4 spike: implications for cell entry and antibody neutralization. *J Virol* 79(13), 8572-8580.
- Petrilli, V., Dostert, C., Muruve, D. A., et Tschopp, J. (2007). The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol* 19(6), 615-622.
- Petrilli, V., Papin, S., et Tschopp, J. (2005). The inflammasome. *Curr Biol* 15(15), R581.
- Pine, S. O., Kublin, J. G., Hammer, S. M., Borgerding, J., Huang, Y., Casimiro, D. R., et McElrath, M. J. (2011). Pre-existing adenovirus immunity modifies a complex mixed Th1 and Th2 cytokine response to an Ad5/HIV-1 vaccine candidate in humans. *PLoS One* 6(4), e18526.
- Pino, O., Martin, M., et Michalek, S. M. (2005). Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. *Infect Immun* 73(10), 6763-6770.
- Plebanski, M., Katsara, M., Sheng, K. C., Xiang, S. D., et Apostolopoulos, V. (2010). Methods to measure T-cell responses. *Expert Rev Vaccines* 9(6), 595-600.
- Plotkin, S. A. (2005). Vaccines: past, present and future. *Nat Med* 11(4 Suppl), S5-11.
- Plotkin, S. A. (2009). Vaccines: the fourth century. *Clin Vaccine Immunol* 16(12), 1709-1719.
- Plotkin, S. A. (2010). Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 17(7), 1055-1065.
- Plotkin, S. A., et Plotkin, S. L. (2011). The development of vaccines: how the past led to the future. *Nat Rev Microbiol* 9(12), 889-893.

- Poncet, D., Corthier, G., Charpilienne, A., et Cohen, J. (1990). A recombinant vaccinia virus expressing the major capsid protein of Simian rotavirus-induced anti-rotavirus antibodies. *Virus Res* 15(3), 267-274.
- Prasad, B. V., Crawford, S., Lawton, J. A., Pesavento, J., Hardy, M., et Estes, M. K. (2001). Structural studies on gastroenteritis viruses. *Novartis Found Symp* 238, 26-37; discussion 37-46.
- Qiao, X., Li, G., Wang, X., Li, X., Liu, M., et Li, Y. (2009). Recombinant porcine rotavirus VP4 and VP4-LTB expressed in *Lactobacillus casei* induced mucosal and systemic antibody responses in mice. *BMC Microbiol* 9, 249.
- Quiding-Jarbrink, M., Nordstrom, I., Granstrom, G., Kilander, A., Jertborn, M., Butcher, E. C., Lazarovits, A. I., Holmgren, J., et Czerkinsky, C. (1997). Differential expression of tissue-specific adhesion molecules on human circulating antibody-forming cells after systemic, enteric, and nasal immunizations. A molecular basis for the compartmentalization of effector B cell responses. *J Clin Invest* 99(6), 1281-1286.
- Ramig, R. F. (1997). Genetics of the rotaviruses. *Annu Rev Microbiol* 51, 225-255.
- Ramig, R. F. (2004). Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 78(19), 10213-10220.
- Randall, R. E., et Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 89(Pt 1), 1-47.
- Ray, P., Fenaux, M., Sharma, S., Malik, J., Subodh, S., Bhatnagar, S., Greenberg, H., Glass, R. I., Gentsch, J., et Bhan, M. K. (2006). Quantitative evaluation of rotaviral antigenemia in children with acute rotaviral diarrhea. *J Infect Dis* 194(5), 588-593.
- Rayburn, E. R., Wang, W., Zhang, R., et Wang, H. (2007). Experimental therapy for colon cancer: anti-cancer effects of TLR9 agonism, combination with other therapeutic modalities, and dependence upon p53. *Int J Oncol* 30(6), 1511-1519.
- Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N., et Friede, M. (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* 30(1), 23-32.
- Rhee, S. H., Im, E., et Pothoulakis, C. (2008). Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Gastroenterology* 135(2), 518-528.

- Rhee, S. H., Im, E., Riegler, M., Kokkotou, E., O'Brien, M., et Pothoulakis, C. (2005). Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(38), 13610-13615.
- Rhee, S. H., Keates, A. C., Moyer, M. P., et Pothoulakis, C. (2004). MEK is a key modulator for TLR5-induced interleukin-8 and MIP3alpha gene expression in non-transformed human colonic epithelial cells. *J Biol Chem* 279(24), 25179-25188.
- Rhee, S. H., Kim, H., Moyer, M. P., et Pothoulakis, C. (2006). Role of MyD88 in phosphatidylinositol 3-kinase activation by flagellin/toll-like receptor 5 engagement in colonic epithelial cells. *J Biol Chem* 281(27), 18560-18568.
- Richardson, J. S., Abou, M. C., Tran, K. N., Kumar, A., Sahai, B. M., et Kobinger, G. P. (2011). Impact of systemic or mucosal immunity to adenovirus on Ad-based Ebola virus vaccine efficacy in guinea pigs. *J Infect Dis* 204 Suppl 3, S1032-1042.
- Rigano, M. M., Dreitz, S., Kipnis, A. P., Izzo, A. A., et Walmsley, A. M. (2006). Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine. *Vaccine* 24(5), 691-695.
- Robert-Guroff, M. (2007). Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development. *Curr Opin Biotechnol* 18(6), 546-556.
- Roberts, D. M., Nanda, A., Havenga, M. J., Abbink, P., Lynch, D. M., Ewald, B. A., Liu, J., Thorner, A. R., Swanson, P. E., Gorgone, D. A., Lifton, M. A., Lemckert, A. A., Holterman, L., Chen, B., Dilraj, A., Carville, A., Mansfield, K. G., Goudsmit, J., et Barouch, D. H. (2006). Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. *Nature* 441(7090), 239-243.
- Robinson, C. M., Singh, G., Henquell, C., Walsh, M. P., Peigue-Lafeuille, H., Seto, D., Jones, M. S., Dyer, D. W., et Chodosh, J. (2011). Computational analysis and identification of an emergent human adenovirus pathogen implicated in a respiratory fatality. *Virology* 409(2), 141-147.
- Rodriguez-Castillo, A., Ramirez-Gonzalez, J. E., Padilla-Noriega, L., et Barron, B. L. (2006). Analysis of human rotavirus G1P[8] strains by RFLP reveals higher genetic drift in the VP7 than the VP4 gene during a 4-year period in Mexico. *J Virol Methods* 138(1-2), 177-183.
- Rodriguez-Diaz, J., Montava, R., Viana, R., Buesa, J., Perez-Martinez, G., et Monedero, V. (2011). Oral immunization of mice with *Lactococcus lactis* expressing the rotavirus VP8* protein. *Biotechnol Lett* 33(6), 1169-1175.

- Rodriguez-Limas, W. A., Tyo, K. E., Nielsen, J., Ramirez, O. T., et Palomares, L. A. (2011). Molecular and process design for rotavirus-like particle production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 10, 33.
- Roldao, A., Mellado, M. C., Castilho, L. R., Carrondo, M. J., et Alves, P. M. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 9(10), 1149-1176.
- Roldao, A., Mellado, M. C., Lima, J. C., Carrondo, M. J., Alves, P. M., et Oliveira, R. (2012). On the effect of thermodynamic equilibrium on the assembly efficiency of complex multi-layered virus-like particles (VLP): the case of rotavirus VLP. *PLoS Comput Biol* 8(2), e1002367.
- Rollier, C. S., Reyes-Sandoval, A., Cottingham, M. G., Ewer, K., et Hill, A. V. (2011). Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight. *Curr Opin Immunol* 23(3), 377-382.
- Rollo, E. E., Kumar, K. P., Reich, N. C., Cohen, J., Angel, J., Greenberg, H. B., Sheth, R., Anderson, J., Oh, B., Hempson, S. J., Mackow, E. R., et Shaw, R. D. (1999). The epithelial cell response to rotavirus infection. *J Immunol* 163(8), 4442-4452.
- Roques, E., Girard, A., St-Louis, M. C., Massie, B., Gagnon, C. A., Lessard, M., et Archambault, D. (2013). Immunogenic and protective properties of GP5 and M structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed from replicating but nondisseminating adenovectors. *Vet Res* 44(1), 17.
- Ruiz, L. P., Jr. (2006). Rotavirus vaccines. *N Engl J Med* 354(16), 1747-1751; author reply 1747-1751.
- Russell, W. C. (2009). Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol* 90(Pt 1), 1-20.
- Ruyssers, N. E., De Winter, B. Y., De Man, J. G., Loukas, A., Pearson, M. S., Weinstock, J. V., Van den Bossche, R. M., Martinet, W., Pelckmans, P. A., et Moreels, T. G. (2009). Therapeutic potential of helminth soluble proteins in TNBS-induced colitis in mice. *Inflammatory bowel diseases* 15(4), 491-500.
- Ryan, E. J., Daly, L. M., et Mills, K. H. (2001). Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends Biotechnol* 19(8), 293-304.
- Saif, L., Yuan, L., Ward, L., et To, T. (1997). Comparative studies of the pathogenesis, antibody immune responses, and homologous protection to porcine and human rotaviruses in gnotobiotic piglets. *Adv Exp Med Biol* 412, 397-403.

- Saif, L. J., Ward, L. A., Yuan, L., Rosen, B. I., et To, T. L. (1996). The gnotobiotic piglet as a model for studies of disease pathogenesis and immunity to human rotaviruses. *Arch Virol Suppl* 12, 153-161.
- Sala, F., Manuela Rigano, M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A. M., et Castiglione, S. (2003). Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine* 21(7-8), 803-808.
- Salazar-Lindo, E., Santisteban-Ponce, J., Chea-Woo, E., et Gutierrez, M. (2000). Racecadotril in the treatment of acute watery diarrhea in children. *N Engl J Med* 343(7), 463-467.
- Saldana, S., Esquivel Guadarrama, F., Olivera Flores Tde, J., Arias, N., Lopez, S., Arias, C., Ruiz-Medrano, R., Mason, H., Mor, T., Richter, L., Arntzen, C. J., et Gomez Lim, M. A. (2006). Production of rotavirus-like particles in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit by expression of capsid proteins VP2 and VP6 and immunological studies. *Viral Immunol* 19(1), 42-53.
- Salman, H. H., Irache, J. M., et Gamazo, C. (2009). Immunoadjuvant capacity of flagellin and mannosamine-coated poly(anhydride) nanoparticles in oral vaccination. *Vaccine* 27(35), 4784-4790.
- Salmi, M., et Jalkanen, S. (2005). Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion, and commitment. *Immunol Rev* 206, 100-113.
- Santos, N., et Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 15(1), 29-56.
- Sarti, F., Perera, G., Hintzen, F., Kotti, K., Karageorgiou, V., Kammona, O., Kiparissides, C., et Bernkop-Schnurch, A. (2011). In vivo evidence of oral vaccination with PLGA nanoparticles containing the immunostimulant monophosphoryl lipid A. *Biomaterials* 32(16), 4052-4057.
- Sasaki, S., Takeshita, F., Xin, K. Q., Ishii, N., et Okuda, K. (2003). Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. *Methods* 31(3), 243-254.
- Schulke, S., Burggraf, M., Waibler, Z., Wangorsch, A., Wolfheimer, S., Kalinke, U., Vieths, S., Toda, M., et Scheurer, S. (2011). A fusion protein of flagellin and ovalbumin suppresses the TH2 response and prevents murine intestinal allergy. *J Allergy Clin Immunol* 128(6), 1340-1348 e1312.

- Schwarz, K., Storni, T., Manolova, V., Didierlaurent, A., Sirard, J. C., Rothlisberger, P., et Bachmann, M. F. (2003). Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses. *Eur J Immunol* 33(6), 1465-1470.
- Sedgmen, B. J., Meeusen, E. N., et Lofthouse, S. A. (2004). Alternative routes of mucosal immunization in large animals. *Immunol Cell Biol* 82(1), 10-16.
- Shaw, A. R. (2006). The rotavirus vaccine saga. *Annu Rev Med* 57, 167-180.
- Sherry, B. (2009). Rotavirus and reovirus modulation of the interferon response. *J Interferon Cytokine Res* 29(9), 559-567.
- Shi, W., Li, Y. H., Liu, F., Yang, J. Y., Zhou, D. H., Chen, Y. Q., Zhang, Y., Yang, Y., He, B. X., Han, C., Fan, M. W., et Yan, H. M. (2012). Flagellin enhances saliva IgA response and protection of anti-carries DNA vaccine. *J Dent Res* 91(3), 249-254.
- Shibata, T., Takemura, N., Motoi, Y., Goto, Y., Karuppuchamy, T., Izawa, K., Li, X., Akashi-Takamura, S., Tanimura, N., Kunisawa, J., Kiyono, H., Akira, S., Kitamura, T., Kitaura, J., Uematsu, S., et Miyake, K. (2012). PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells. *Int Immunol* 24(10), 613-23.
- Shott, J. P., McGrath, S. M., Pau, M. G., Custers, J. H., Ophorst, O., Demoitie, M. A., Dubois, M. C., Komisar, J., Cobb, M., Kester, K. E., Dubois, P., Cohen, J., Goudsmit, J., Heppner, D. G., et Stewart, V. A. (2008). Adenovirus 5 and 35 vectors expressing Plasmodium falciparum circumsporozoite surface protein elicit potent antigen-specific cellular IFN-gamma and antibody responses in mice. *Vaccine* 26(23), 2818-2823.
- Sierro, F., Dubois, B., Coste, A., Kaiserlian, D., Kraehenbuhl, J. P., et Sirard, J. C. (2001). Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24), 13722-13727.
- Sigal, L. J., Crotty, S., Andino, R., et Rock, K. L. (1999). Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 398(6722), 77-80.
- Silin, D. S., Lyubomska, O. V., Jirathitikal, V., et Bourinbaiar, A. S. (2007). Oral vaccination: where we are? *Expert Opin Drug Deliv* 4(4), 323-340.
- Silvestri, L. S., Taraporewala, Z. F., et Patton, J. T. (2004). Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *J Virol* 78(14), 7763-7774.

- Simon, J., et Kotloff, K. (2010). New and candidate vaccines for gastrointestinal infections. *Curr Opin Gastroenterol* 26(1), 12-16.
- Simon, R., et Samuel, C. E. (2008). Interleukin-1 beta secretion is activated comparably by FliC and FljB flagellins but differentially by wild-type and DNA adenine methylase-deficient salmonella. *J Interf Cytok Res* 28(11), 661-666.
- Singh, N., Pandey, A., Jayashankar, L., et Mittal, S. K. (2008). Bovine adenoviral vector-based H5N1 influenza vaccine overcomes exceptionally high levels of pre-existing immunity against human adenovirus. *Mol Ther* 16(5), 965-971.
- Skountzou, I., Martin Mdel, P., Wang, B., Ye, L., Koutsouanos, D., Weldon, W., Jacob, J., et Compans, R. W. (2010). Salmonella flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. *Vaccine* 28(24), 4103-4112.
- Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L., Cookson, B. T., et Aderem, A. (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 4(12), 1247-1253.
- Soares-Weiser, K., Maclehose, H., Ben-Aharon, I., Goldberg, E., Pitan, F., et Cunliffe, N. (2010). Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use. *Cochrane Database Syst Rev* 5, CD008521.
- Soares-Weiser, K., Maclehose, H., Bergman, H., Ben-Aharon, I., Nagpal, S., Goldberg, E., Pitan, F., et Cunliffe, N. (2012). Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use. *Cochrane Database Syst Rev* 2, CD008521.
- Soler, E., Perez, N., Passet, B., Dubuquoy, C., Riffault, S., Pillot, M., Houdebine, L. M., et Schwartz-Cornil, I. (2007). Recombinant rotavirus inner core proteins produced in the milk of transgenic rabbits confer a high level of protection after intrarectal delivery. *Vaccine* 25(34), 6373-6380.
- Song, L., Zhang, Y., Yun, N. E., Poussard, A. L., Smith, J. N., Smith, J. K., Borisevich, V., Linde, J. J., Zacks, M. A., Li, H., Kavita, U., Reiserova, L., Liu, X., Dumuren, K., Balasubramanian, B., Weaver, B., Parent, J., Umlauf, S., Liu, G., Huleatt, J., Tussey, L., et Paessler, S. (2009). Superior efficacy of a recombinant flagellin:H5N1 HA globular head vaccine is determined by the placement of the globular head within flagellin. *Vaccine* 27(42), 5875-5884.
- Souza, A. P., Haut, L., Reyes-Sandoval, A., et Pinto, A. R. (2005). Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. *Braz J Med Biol Res* 38(4), 509-522.

- Sparer, T. E., Tripp, R. A., Dillehay, D. L., Hermiston, T. W., Wold, W. S., et Gooding, L. R. (1996). The role of human adenovirus early region 3 proteins (gp19K, 10.4K, 14.5K, and 14.7K) in a murine pneumonia model. *J Virol* 70(4), 2431-2439.
- Stallwood, Y., Fisher, K. D., Gallimore, P. H., et Mautner, V. (2000). Neutralisation of adenovirus infectivity by ascitic fluid from ovarian cancer patients. *Gene Ther* 7(8), 637-643.
- Steffensen, M. A., Jensen, B. A., Holst, P. J., Bassi, M. R., Christensen, J. P., et Thomsen, A. R. (2012). Pre-existing vector immunity does not prevent replication deficient adenovirus from inducing efficient CD8 T-cell memory and recall responses. *PLoS One* 7(4), e34884.
- Stewart, P. L., Fuller, S. D., et Burnett, R. M. (1993). Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *Embo J* 12(7), 2589-2599.
- Stilwell, J. L., et Samulski, R. J. (2004). Role of viral vectors and virion shells in cellular gene expression. *Mol Ther* 9(3), 337-346.
- Streatfield, S. J., et Howard, J. A. (2003). Plant production systems for vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2(6), 763-775.
- Summerton, N. A., Welch, R. W., Bondoc, L., Yang, H. H., Pleune, B., Ramachandran, N., Harris, A. M., Bland, D., Jackson, W. J., Park, S., Clements, J. D., et Nabors, G. S. (2010). Toward the development of a stable, freeze-dried formulation of *Helicobacter pylori* killed whole cell vaccine adjuvanted with a novel mutant of *Escherichia coli* heat-labile toxin. *Vaccine* 28(5), 1404-1411.
- Sun, C., Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, M., et Chen, L. (2011). Short communication: enhancement of immunogenicity of replication-defective adenovirus-based human immunodeficiency virus vaccines in rhesus monkeys. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27(6), 681-686.
- Sun, H. X., Xie, Y., et Ye, Y. P. (2009). ISCOMs and ISCOMATRIX. *Vaccine* 27(33), 4388-4401.
- Sun, J. B., Czerkinsky, C., et Holmgren, J. (2010). Mucosally induced immunological tolerance, regulatory T cells and the adjuvant effect by cholera toxin B subunit. *Scand J Immunol* 71(1), 1-11.
- Sutterwala, F. S., Ogura, Y., et Flavell, R. A. (2007). The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *J Leukoc Biol* 82(2), 259-264.

- Szymanski, C. M., Logan, S. M., Linton, D., et Wren, B. W. (2003). Campylobacter--a tale of two protein glycosylation systems. *Trends Microbiol* 11(5), 233-238.
- Takakura, Y., Che, F. S., Ishida, Y., Tsutsumi, F., Kurotani, K., Usami, S., Isogai, A., et Imaseki, H. (2008). Expression of a bacterial flagellin gene triggers plant immune responses and confers disease resistance in transgenic rice plants. *Mol Plant Pathol* 9(4), 525-529.
- Takata, T., Shirakawa, T., Kawasaki, Y., Kinoshita, S., Gotoh, A., Kano, Y., et Kawabata, M. (2006). Genetically engineered Bifidobacterium animalis expressing the Salmonella flagellin gene for the mucosal immunization in a mouse model. *J Gene Med* 8(11), 1341-1346.
- Takeda, K., et Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16(1), 3-9.
- Tamanini, A., Nicolis, E., Bonizzato, A., Bezzerri, V., Melotti, P., Assael, B. M., et Cabrini, G. (2006). Interaction of adenovirus type 5 fiber with the coxsackievirus and adenovirus receptor activates inflammatory response in human respiratory cells. *J Virol* 80(22), 11241-11254.
- Taraporewala, Z. F., et Patton, J. T. (2004). Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus Res* 101(1), 57-66.
- Tatsis, N., et Ertl, H. C. (2004). Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther* 10(4), 616-629.
- Tatsis, N., Lin, S. W., Harris-McCoy, K., Garber, D. A., Feinberg, M. B., et Ertl, H. C. (2007). Multiple immunizations with adenovirus and MVA vectors improve CD8+ T cell functionality and mucosal homing. *Virology* 367(1), 156-167.
- Taylor, D. N., Treanor, J. J., Strout, C., Johnson, C., Fitzgerald, T., Kavita, U., Ozer, K., Tussey, L., et Shaw, A. (2011). Induction of a potent immune response in the elderly using the TLR-5 agonist, flagellin, with a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125, STF2.HA1 SI). *Vaccine* 29(31), 4897-4902.
- Tecchio, C., Huber, V., Scapini, P., Calzetti, F., Margotto, D., Todeschini, G., Pilla, L., Martinelli, G., Pizzolo, G., Rivoltini, L., et Cassatella, M. A. (2004). IFN α -stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood* 103(10), 3837-3844.
- Theisen, M., Soe, S., Brunstedt, K., Follmann, F., Bredmose, L., Israelsen, H., Madsen, S. M., et Druilhe, P. (2004). A Plasmodium falciparum GLURP-MSP3 chimeric

- protein; expression in *Lactococcus lactis*, immunogenicity and induction of biologically active antibodies. *Vaccine* 22(9-10), 1188-1198.
- Thorstenson, K. M., et Khoruts, A. (2001). Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J Immunol* 167(1), 188-195.
- Tincer, G., Yerlikaya, S., Yagci, F. C., Kahraman, T., Atanur, O. M., Erbatur, O., et Gursel, I. (2011). Immunostimulatory activity of polysaccharide-poly(I:C) nanoparticles. *Biomaterials* 32(18), 4275-4282.
- Torres-Vega, M. A., Gonzalez, R. A., Duarte, M., Poncet, D., Lopez, S., et Arias, C. F. (2000). The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J Gen Virol* 81(Pt 3), 821-830.
- Tosch, C., Geist, M., Ledoux, C., Ziller-Remi, C., Paul, S., Erbs, P., Corvaia, N., Von Hoegen, P., Balloul, J. M., et Haegel, H. (2009). Adenovirus-mediated gene transfer of pathogen-associated molecular patterns for cancer immunotherapy. *Cancer Gene Ther* 16(4), 310-319.
- Trask, S. D., et Dormitzer, P. R. (2006). Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. *J Virol* 80(22), 11293-11304.
- Turley, C. B., Rupp, R. E., Johnson, C., Taylor, D. N., Wolfson, J., Tussey, L., Kavita, U., Stanberry, L., et Shaw, A. (2011). Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. *Vaccine* 29(32), 5145-5152.
- Uematsu, S., Jang, M. H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K., et Akira, S. (2006). Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat Immunol* 7(8), 868-874.
- Valenzuela, S., Pizarro, J., Sandino, A. M., Vasquez, M., Fernandez, J., Hernandez, O., Patton, J., et Spencer, E. (1991). Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J Virol* 65(7), 3964-3967.
- Vancott, J. L., McNeal, M. M., Choi, A. H., et Ward, R. L. (2003). The role of interferons in rotavirus infections and protection. *J Interferon Cytokine Res* 23(3), 163-170.

- Varshney, G. C., Mahana, W., Filloux, A. M., A., V., et Paraf, A. (1991). Structure of native and heat-denaturated ovalbumin as revealed by monoclonal antibodies epitopic changes during heat treatment. *J Food Sci* 56(1), 224-227.
- Vesikari, T. (2012). Rotavirus vaccination: a concise review. *Clin Microb Inf Dis* 18 Suppl 5:57-63.
- Vesikari, T., Clark, H. F., Offit, P. A., Dallas, M. J., DiStefano, D. J., Goveia, M. G., Ward, R. L., Schodel, F., Karvonen, A., Drummond, J. E., DiNubile, M. J., et Heaton, P. M. (2006). Effects of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in healthy infants. *Vaccine* 24(22), 4821-4829.
- Vezina, L. P., Faye, L., Lerouge, P., D'Aoust, M. A., Marquet-Blouin, E., Burel, C., Lavoie, P. O., Bardor, M., et Gomord, V. (2009). Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnol J* 7(5), 442-455.
- Vicente-Suarez, I., Brayer, J., Villagra, A., Cheng, F., et Sotomayor, E. M. (2009). TLR5 ligation by flagellin converts tolerogenic dendritic cells into activating antigen-presenting cells that preferentially induce T-helper 1 responses. *Immunol Lett* 125(2), 114-118.
- Vinner, L., Wee, E. G., Patel, S., Corbet, S., Gao, G. P., Nielsen, C., Wilson, J. M., Ertl, H. C., Hanke, T., et Fomsgaard, A. (2003). Immunogenicity in Mamu-A*01 rhesus macaques of a CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 envelope from the primary isolate (Bx08) after synthetic DNA prime and recombinant adenovirus 5 boost. *J Gen Virol* 84(Pt 1), 203-213.
- Walsh, M. P., Seto, J., Liu, E. B., Dehghan, S., Hudson, N. R., Lukashev, A. N., Ivanova, O., Chodosh, J., Dyer, D. W., Jones, M. S., et Seto, D. (2011). Computational analysis of two species C human adenoviruses provides evidence of a novel virus. *J Clin Microbiol* 49(10), 3482-3490.
- Wang, J., Thorson, L., Stokes, R. W., Santosuosso, M., Huygen, K., Zganiacz, A., Hitt, M., et Xing, Z. (2004). Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis. *J Immunol* 173(10), 6357-6365.
- Wang, L., Huang, J. A., Nagesha, H. S., Smith, S. C., Phelps, A., Holmes, I., Martyn, J. C., Coloe, P. J., et Reeves, P. R. (1999). Bacterial expression of the major antigenic regions of porcine rotavirus VP7 induces a neutralizing immune response in mice. *Vaccine* 17(20-21), 2636-2645.

- Wang, M., Shu, Y., Qu, J. G., Wang, J. W., et Hong, T. (2008). [Improved expression of human rotavirus G1VP7 and G3VP7 antigens in the recombinant adenoviruses by codon optimization]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 22(6), 437-439.
- Wang, Y., Azevedo, M., Saif, L. J., Gentsch, J. R., Glass, R. I., et Jiang, B. (2010). Inactivated rotavirus vaccine induces protective immunity in gnotobiotic piglets. *Vaccine* 28(33), 5432-5436.
- Ward, L. A., Yuan, L., Rosen, B. I., To, T. L., et Saif, L. J. (1996). Development of mucosal and systemic lymphoproliferative responses and protective immunity to human group A rotaviruses in a gnotobiotic pig model. *Clin Diagn Lab Immunol* 3(3), 342-350.
- Ward, R. L. (2003). Possible mechanisms of protection elicited by candidate rotavirus vaccines as determined with the adult mouse model. *Viral Immunol* 16(1), 17-24.
- Ward, R. L., Clark, H. F., et Offit, P. A. (2010). Influence of potential protective mechanisms on the development of live rotavirus vaccines. *J Infect Dis* 202 Suppl, S72-79.
- Ward, R. L., McNeal, M. M., et Sheridan, J. F. (1990). Development of an adult mouse model for studies on protection against rotavirus. *J Virol* 64(10), 5070-5075.
- Wassilak, S., Pate, M. A., Wannemuehler, K., Jenks, J., Burns, C., Chenoweth, P., Abanida, E. A., Adu, F., Baba, M., Gasasira, A., Iber, J., Mkanda, P., Williams, A. J., Shaw, J., Pallansch, M., et Kew, O. (2011). Outbreak of type 2 vaccine-derived poliovirus in Nigeria: emergence and widespread circulation in an underimmunized population. *J Infect Dis* 203(7), 898-909.
- Watanabe, H., Gehrke, S., Contassot, E., Roques, S., Tschopp, J., Friedmann, P. S., French, L. E., et Gaide, O. (2008). Danger signaling through the inflammasome acts as a master switch between tolerance and sensitization. *J Immunol* 180(9), 5826-5832.
- Wei, H. J., Chang, W., Lin, S. C., Liu, W. C., Chang, D. K., Chong, P., et Wu, S. C. (2011). Fabrication of influenza virus-like particles using M2 fusion proteins for imaging single viruses and designing vaccines. *Vaccine* 29(41), 7163-7172.
- Wei, Q., Jiang, X. L., Wang, J. W., et Hong, T. (2004). [Expression of main neutralization antigen VP7 of human rotavirus serotype G2 and G3 by recombinant adenoviruses]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 18(1), 12-15.
- Weiner, H. L., da Cunha, A. P., Quintana, F., et Wu, H. (2011). Oral tolerance. *Immunol Rev* 241(1), 241-259.

- Weitkamp, J. H., Kallewaard, N., Kusuvara, K., Bures, E., Williams, J. V., LaFleur, B., Greenberg, H. B., et Crowe, J. E., Jr. (2003). Infant and adult human B cell responses to rotavirus share common immunodominant variable gene repertoires. *J Immunol* 171(9), 4680-4688.
- Weitkamp, J. H., Kallewaard, N. L., Bowen, A. L., Lafleur, B. J., Greenberg, H. B., et Crowe, J. E., Jr. (2005). VH1-46 is the dominant immunoglobulin heavy chain gene segment in rotavirus-specific memory B cells expressing the intestinal homing receptor alpha4beta7. *J Immunol* 174(6), 3454-3460.
- Weitkamp, J. H., Lafleur, B. J., et Crowe, J. E., Jr. (2006). Rotavirus-specific CD5+ B cells in young children exhibit a distinct antibody repertoire compared with CD5- B cells. *Hum Immunol* 67(1-2), 33-42.
- Wigdorovitz, A., Mozgovoij, M., Santos, M. J., Parreno, V., Gomez, C., Perez-Filgueira, D. M., Trono, K. G., Rios, R. D., Franzone, P. M., Fernandez, F., Carrillo, C., Babiuk, L. A., Escribano, J. M., et Borca, M. V. (2004). Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants. *J Gen Virol* 85(Pt 7), 1825-1832.
- Williams, I. R. (2004). Chemokine receptors and leukocyte trafficking in the mucosal immune system. *Immunol Res* 29(1-3), 283-292.
- Williams, M. B., Rose, J. R., Rott, L. S., Franco, M. A., Greenberg, H. B., et Butcher, E. C. (1998). The memory B cell subset responsible for the secretory IgA response and protective humoral immunity to rotavirus expresses the intestinal homing receptor, alpha4beta7. *J Immunol* 161(8), 4227-4235.
- Wilson, N. A., et Watkins, D. I. (2009). Is an HIV vaccine possible? *Braz J Infect Dis* 13(4), 304-310.
- Wolf, M., Vo, P. T., et Greenberg, H. B. (2011). Rhesus rotavirus entry into a polarized epithelium is endocytosis dependent and involves sequential VP4 conformational changes. *J Virol* 85(6), 2492-2503.
- World-Health-Organization (2007). Rotavirus vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 82(32), 285-295.
- World-Health-Organization (2012). Global Advisory Committee on Vaccine Safety, December 2011. *Wkly Epidemiol Rec* 87(6), 53-59.
- Xu, J., Yang, Y., Sun, J. E., Ding, Y. Z., Su, L. Y., et Shao, C. H. (2007). [Expression of Toll-like receptors in mononuclear cells from children with acute rotavirus diarrhea]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 21(1), 38-40.

- Xu, Y., Guan, W., Xu, J. N., Cao, D. P., Yang, B. B., Chen, D. L., et Chen, J. P. (2011). Evaluation of the protective immunity of the *Legionella pneumophila* recombinant protein FlaA/MompS/PilE in an A/J mouse model. *Vaccine* 29(23), 4051-4057.
- Yamaguchi, T., Kawabata, K., Koizumi, N., Sakurai, F., Nakashima, K., Sakurai, H., Sasaki, T., Okada, N., Yamanishi, K., et Mizuguchi, H. (2007). Role of MyD88 and TLR9 in the innate immune response elicited by serotype 5 adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 18(8), 753-762.
- Yamamoto, S., Wada, J., Katayama, T., Jikimoto, T., Nakamura, M., Kinoshita, S., Lee, K. M., Kawabata, M., et Shirakawa, T. (2010). Genetically modified *Bifidobacterium* displaying *Salmonella*-antigen protects mice from lethal challenge of *Salmonella* Typhimurium in a murine typhoid fever model. *Vaccine* 28(41), 6684-6691.
- Yang, Y., Li, X., Yang, H., Qian, Y., Zhang, Y., Fang, R., et Chen, X. (2011). Immunogenicity and virus-like particle formation of rotavirus capsid proteins produced in transgenic plants. *Sci China Life Sci* 54(1), 82-89.
- Yen, C., Tate, J. E., Patel, M. M., Cortese, M. M., Lopman, B., Fleming, J., Lewis, K., Jiang, B., Gentsch, J., Steele, D., et Parashar, U. D. (2011). Rotavirus vaccines: update on global impact and future priorities. *Hum Vaccin* 7(12), 1282-1290.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., et Namba, K. (2003). Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* 424(6949), 643-650.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., et Namba, K. (2005). Building the atomic model for the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy and image analysis. *Structure* 13(3), 407-412.
- Yoshio-Hoshino, N., Adachi, Y., Aoki, C., Pereboev, A., Curiel, D. T., et Nishimoto, N. (2007). Establishment of a new interleukin-6 (IL-6) receptor inhibitor applicable to the gene therapy for IL-6-dependent tumor. *Cancer Res* 67(3), 871-875.
- Youngman, K. R., Franco, M. A., Kuklin, N. A., Rott, L. S., Butcher, E. C., et Greenberg, H. B. (2002). Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen-specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response. *J Immunol* 168(5), 2173-2181.
- Yu, H. B., et Finlay, B. B. (2008). The caspase-1 inflammasome: a pilot of innate immune responses. *Cell Host Microbe* 4(3), 198-208.
- Yu, J., et Langridge, W. (2003). Expression of rotavirus capsid protein VP6 in transgenic potato and its oral immunogenicity in mice. *Transgenic Res* 12(2), 163-169.

- Yuan, L., Geyer, A., Hodgins, D. C., Fan, Z., Qian, Y., Chang, K. O., Crawford, S. E., Parreno, V., Ward, L. A., Estes, M. K., Conner, M. E., et Saif, L. J. (2000). Intranasal administration of 2/6-rotavirus-like particles with mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin (LT-R192G) induces antibody-secreting cell responses but not protective immunity in gnotobiotic pigs. *J Virol* 74(19), 8843-8853.
- Yuan, L., Iosef, C., Azevedo, M. S., Kim, Y., Qian, Y., Geyer, A., Nguyen, T. V., Chang, K. O., et Saif, L. J. (2001a). Protective immunity and antibody-secreting cell responses elicited by combined oral attenuated Wa human rotavirus and intranasal Wa 2/6-VLPs with mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin in gnotobiotic pigs. *J Virol* 75(19), 9229-9238.
- Yuan, L. Y., Liu, Y., Li, C. H., Sun, M. S., et Dai, C. B. (2001b). [Expression in *Escherichia coli* and immunogenicity of rotavirus VP7]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 17(2), 145-149.
- Zaiss, A. K., Vilaysane, A., Cotter, M. J., Clark, S. A., Meijndert, H. C., Colarusso, P., Yates, R. M., Petrilli, V., Tschopp, J., et Muruve, D. A. (2009). Antiviral antibodies target adenovirus to phagolysosomes and amplify the innate immune response. *J Immunol* 182(11), 7058-7068.
- Zeng, H., Wu, H., Sloane, V., Jones, R., Yu, Y., Lin, P., Gewirtz, A. T., et Neish, A. S. (2006). Flagellin/TLR5 responses in epithelia reveal intertwined activation of inflammatory and apoptotic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(1), G96-G108.
- Zeng, M., Xu, Q., Elias, M., Pichichero, M. E., Simpson, L. L., et Smith, L. A. (2007). Protective immunity against botulism provided by a single dose vaccination with an adenovirus-vectored vaccine. *Vaccine* 25(43), 7540-7548.
- Zhao, W., Xia, M., Bridges-Malveo, T., Cantu, M., McNeal, M. M., Choi, A. H., Ward, R. L., et Sestak, K. (2005). Evaluation of rotavirus dsRNA load in specimens and body fluids from experimentally infected juvenile macaques by real-time PCR. *Virology* 341(2), 248-256.
- Zheng, Q., Chen, D., Li, P., Bi, Z., Cao, R., Zhou, B., et Chen, P. (2007). Co-expressing GP5 and M proteins under different promoters in recombinant modified vaccinia virus ankara (rMVA)-based vaccine vector enhanced the humoral and cellular immune responses of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Genes* 35(3), 585-595.
- Zhong, Z., Xu, Z., Peng, L., Huang, L., Fang, X., et Cen, P. (2006). Tandem repeat mhBD2 gene enhance the soluble fusion expression of hBD2 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 71(5), 661-667.

- Zhou, B., Zhang, Y., Wang, X., Dong, J., Wang, B., Han, C., Yu, J., et Li, D. (2010a). Oral administration of plant-based rotavirus VP6 induces antigen-specific IgAs, IgGs and passive protection in mice. *Vaccine* 28(37), 6021-6027.
- Zhou, H., Guo, L., Wang, M., Qu, J., Zhao, Z., Wang, J., et Hung, T. (2011). Prime immunization with rotavirus VLP 2/6 followed by boosting with an adenovirus expressing VP6 induces protective immunization against rotavirus in mice. *Virol J* 8, 3.
- Zhou, J. X., Xue, J. D., Yu, T., Zhang, J. B., Liu, Y., Jiang, N., Li, Y. L., et Hu, R. L. (2010b). Immune responses in pigs induced by recombinant canine adenovirus 2 expressing the glycoprotein 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Res Commun* 34(4), 371-380.
- Zhu, J., Huang, X., et Yang, Y. (2007). Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways. *J Virol* 81(7), 3170-3180.
- Zhu, Q., Thomson, C. W., Rosenthal, K. L., McDermott, M. R., Collins, S. M., et Gauldie, J. (2008). Immunization with adenovirus at the large intestinal mucosa as an effective vaccination strategy against sexually transmitted viral infection. *Mucosal Immunol* 1(1), 78-88.
- Zickafoose, J. S., Benneyworth, B. D., Riebschleger, M. P., Espinosa, C. M., et Davis, M. M. (2012). Hospitalizations for Intussusception Before and After the Reintroduction of Rotavirus Vaccine in the United States. *Arch Pediatr Adolesc Med*.
- Zsengeller, Z., Otake, K., Hossain, S. A., Berclaz, P. Y., et Trapnell, B. C. (2000). Internalization of adenovirus by alveolar macrophages initiates early proinflammatory signaling during acute respiratory tract infection. *J Virol* 74(20), 9655-9667.